食品総合研究所研究報告

第　77　号

平成 25 年 3 月

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

食品総合研究所報告（第77号）目次

報　文

研究ノート

技術報告

国連大学生研究成果

抄　録

付　録

報　文

A simple mechanical index of storage quality of strawberry fruits

Kaoru KOHYAMA[*§], Tomohiro MASUDA[**], Hiromi SHIMADA[*],Toshie TANAKA[*], and Yuji WADA[**]

[*] Food Physics Laboratory and [**] Sensory and Cognitive Food Science Laboratory,
Food Function Division, National Food Research Institute,
National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

We propose simple mechanical parameters obtained by compression testing to indicate the storage quality of strawberry fruits. We tested the effects of different storage conditions at 5℃ on measured mechanical parameters. The three conditions were control, in polyethylene bag, and packed a product that releases allyl isothiocyanate (AIT) vapor, as it is known that vaporized AIT prevents the growth of microorganisms. Although the fracture load, often referred to as firmness, did not significantly vary, the fracture strain increased and the apparent modulus decreased with storage time. The apparent modulus was demonstrated to be a good index of strawberry quality, because it is more sensitive to deterioration of strawberry fruits and calculated at a low strain that has the potential of a non-destructive measurement.

Key words: strawberry, compression test, apparent modulus, mechanical properties, cold storage

Introduction

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*, Duch.) is a typical non-climacteric fruit. In other words, it does not exhibit a dramatic increase in respiratory activity after harvest, and also produces less ethylene (Tatsuki, 2007). As strawberry fruits are harvested when ripe, their quality declines rapidly. They are very susceptible to attack by microorganisms and mechanical injury during handling and transportation (Wills and Kim, 1995). Loss of quality often occurs because of water loss, softening, and bruising during handling, transportation, and storage (Bower et al., 2003; Wills and Kim, 1995). The storage life of strawberries is less than a week, even under ideal conditions (Wills, 1998).

Palatability of fruits is generally higher in sweeter individual fruit. Sweetness of strawberry fruits correlates with the ratio of soluble sugar content and to titratable acidity (Gunness et al., 2009). These results were obtained from strawberries pureed to produce a homogenous sample; many individual fruits were included in the purées used for sensory evaluation. In our study, varying mechanical properties of individual fruits were measured at similar stages of storage. A methodology that uses pureed samples or juice instead of raw fruits for sweetness determination does not detect important interactions between sweetness and mechanical properties. Softer fruits are likely perceived to have higher sweetness even though they may have soluble sugar content similar to those of harder fruits. Flavor release is modified by the texture of foods, hence there is an interaction between sugar content and mechanical properties of fruits. Sensory studies using gels and sols as model foods show that flavor

[§]correspondence author: Phone: Tel: +81－029－838－8031, Fax: +81－029－838－7996
e-mail: kaoruk@affrc.go.jp

intensity is reduced in firmer gels and thicker liquids (Calviño et al., 1993; Clark, 2002; Cook et al., 2003).

Luminance distribution most likely influences the visual assessment of fruit freshness rather than color information (Arce-Lopera et al., 2012). Freshness of strawberry fruits determined by consensus ratings is more reliable than any single indicator of freshness including firmness, soluble solids, and titratable acidity (Péneau et al., 2007). Péneau et al. (2007) determined maximum force and the gradient of the compression curve up to 75% compression of single whole strawberry fruit under a flat plate (75 mm diameter). Parameters measured by this methodology decreased slightly with storage time, but they did not correlate with subjective freshness assessments. Retailers often set shelf lives of processed foods to durations shorter than the time period through to the onset of visible damage. This is because eating quality may be determined by textural and/or flavor changes of fruits.

In the current study, we performed compression testing of strawberry fruits after harvest to establish an objective index of fruit softening. Several mechanical properties may influence the texture and flavor of strawberries. The modulus of elasticity may be calculated by compression testing of materials with convex shapes (American Society of Agricultural Engineers, 2000), but has rarely been determined for strawberry fruits. Because the strawberry fruit has an irregular shape, its heterogeneity prevents derivation of the Poisson's ratio. Furthermore, the fruit is rather diminutive in relation to many types of probe. Thus, a simple compression test, which uses a cylindrical probe with a diameter 3.0–7.5 mm to penetrate the equator of individual strawberry fruits, has commonly been adopted (Døving and Måge, 2002; Døving et al., 2005; Gunness et al., 2009; Hernández-Muñoz et al., 2006; Hietaranta and Linna, 1999; Khosroshahi et al., 2007). Firmness, determined as the peak force, is frequently used rather than the elastic modulus; firmness decreases through the storage period (Caner et al., 2008; Døving and Måge, 2002; Døving et al., 2005; Hernández-Muñoz et al., 2006; Nunes et al., 2006; Tian et al., 2000). In this study, we performed a simple compression test on strawberry fruits to calculate an apparent modulus as the ratio of stress to strain at a very small deformation.

Strawberry fruits were kept at 5℃ on a soft tray and covered with plastic film and/or were treated with a natural anti-bacterial product to lengthen storage life. Degradation of fruits and vegetables during distribution and storage may be moderated by allyl isothiocyanate (AIT, 3-isothiocyanato-1-propene), which is a pungent component present in some members of the *Brassicaceae*, such as horseradish (*Armoracia rusticana*), wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.), and brown mustard (*Brassica juncea*). The growth of many microorganisms (bacteria, yeasts, and molds) is prevented by vaporized AIT. Growth of some fungi is prevented at a lower level (<20 ppm) of AIT (Goi et al., 1985; Kanemaru and Miyamoto, 1990; Issiki et al., 1992; Sekiyama, 2009). AIT has been employed on strawberry fruits to prevent mold growth and softening over three days (Takagi and Naito, 1993), but there are no detailed reports on conditions required for this effects.

In this study, we found that the apparent modulus is a more sensitive measure of changes in the mechanical properties of strawberry fruits than firmness during storage. It is a good indicator of the shelf life of strawberries stored at low temperatures.

Materials and Methods

1. Strawberries

We used strawberry fruits (var. *Yayoihime*), each weighting approximately 13 g. Harvest date was March 8, 2010 (Fujio Co., Maebashi, Gunma, Japan). Fully ripened and ready-to-eat fruits were arranged on a soft tray with 25 hollows (5 rows × 5 columns, 210 × 280 × 22 mm) made from foamed polystyrene; polypropyrene (PP) film was wrapped over the tray and taped at both sides.

2. Transportation and storage condition

We used Wasapure® (Ageless Service Center Co. Ltd., Tokyo, Japan) was used as an AIT release agent to preserve the freshness of strawberry fruits. The product vaporizes AIT into the storage atmosphere and it releases 0.2–10.0 ppm (v/v) of AIT into containers of fresh foodstuffs with no production of an "off-flavor" from the wasabi (Oshida et al., 2010). Two gram of paste made up of horseradish and mustard extracts in filler compounds (0.35–0.45% (v/v)) was packed in small plastic bags (40 × 35 mm). The amount of AIT release product (by pack per tray) was determined through preliminary tests. Gas chromatography analysis revealed that approximately 0.6 ppm (v/v) of AIT was maintained for at least one week in the storage atmosphere

of a strawberry transportation cardboard box (250 × 350 × 75 mm) wrapped by polyethylene (PE) film.

Three storage conditions were compared: (A), a pack of AIT product was inserted under the PP film in each tray and the tray was placed into an unsealed PE bag; (B), treatment as in (A) but without AIT product; (C) control with no AIT product or PE bag. Two trays were placed into each cardboard box (305 × 450 × 80 mm), and six cardboard boxes were stacked and tied. Samples were transported from the farm to the National Food Research Institute in a refrigerated truck at 5℃. They arrived without visible damage the day after harvest and were stored in a cold room at 5℃ until measurements.

3. Quality evaluation

Damaged fruits with mold growth or with muddy parts were visually identified by three experimenters. Sample strawberry fruits, including damaged ones in the same tray, were moved to the test room (23℃) 3 h before mechanical measurements were made 2, 4, 8, 11, and 16 days after harvest. All 25 fruits in each tray were weighed, and the diameter, length, and weight of each were recorded.

An instrumental compression test was performed using a Universal Testing Machine (Model 5542; Instron, Canton, MA, USA) with an attached load cell of 50 N. A stainless steel cylindrical plunger of 3.0-mm diameter was inserted into each fruit at a constant speed of 1.0 mm/s. Two equatorial parts (in diagonal position) and the apex of each whole fruit were tested; measurements were made on 10 fruits. Compressive strain was calculated as displacement divided by the diameter or length of each fruit. Strawberry fruits do not have a fixed shape with a flat surface; hence, Young's modulus, which can be derived from a simple tensile or compression test, could not be correctly calculated in the present experiment. Under our test conditions, the peripheral part of the plunger may affect the force value, even under small strains (< 0.1). Hence, we used the term apparent modulus rather than Young's modulus. The apparent modulus was calculated with Blue Hill software (Instron) based on the maximum slope of load versus displacement curve. This value was derived as the ratio of stress (load divided by the cross sectional area of the plunger (7.08 mm^2)) and strain. The fracture load and strain were determined at peak values.

Immediately after the mechanical test, pH (C-73, As One Corporation, Osaka, Japan) and Brix (PAL-1, Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan) values were measured close to the punctured holes.

4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software (ver. 17.0J for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with statistical significance set at $p < 0.05$. We conducted one-way analyses of variance (ANOVA) with treatments (3) or storage periods (5) as factors. Two-way ANOVA was used to test for significant interactions between treatments and storage periods. Paired *t*-tests were performed to compare values for individual fruits.

Results

1. Mechanical properties

Figure 1 shows typical compression curves for fresh and damaged strawberries. For fresh fruit, the slope of the load versus deformation curve was almost straight. There was a break point at approximately 1.4 mm compressive deformation, corresponding to strains of < 0.06–0.07, after which the load decreased rapidly. Load and deformation at the peak (gray triangle) were easily determined. We calculated the fracture load and strain after standardization using initial diameter of each fruit. The maximum slope (see auxiliary straight line in Fig. 1) of the load–strain curve up to the fracture point was divided by the cross-sectional area of the plunger (Gunness et al., 2009). The apparent modulus in MPa was subsequently obtained based on the converted slope. Strawberry fruits do not soften during the first few days, but they do over extended storage periods. Compressive load and modulus decreased significantly after a long storage, while the fracture strain increased. Damaged fruits completely covered with mold were extremely soft. Although the fracture in damaged fruits occurred at a slightly higher strain and a much lower force than in undamaged fruits, the load decrease following fracture was not significant in damaged fruits (Fig. 1). We analyzed temporal changes in the mechanical properties of strawberry fruits before fruits were completely damaged to this extent.

Among the mechanical parameters, the fracture strain increased and the apparent modulus decreased gradually with storage period (Fig. 2). The fracture load did not significantly change with storage or among treatments.

There was a significant decrease in the fracture load in damaged fruits after a long storage period (> 10 days) leading to unacceptable fruit quality. After 16 days, the standard error increased (Fig. 2) because of ones very soft, aged individual fruits (Fig. 1), but there were still a few undamaged individual fruits with mechanical properties similar to those of fresh strawberry fruits (Fig. 1).

2. Comparison with other measures

No damaged fruits were apparent in visual inspections of 25 fruit trays during the first several days of storage at 5℃ under any of the treatments as shown in Fig. 3. Control samples (C) demonstrated the most rapid quality degradation (20% change) during the experiment. Differences between treatments were first observed at 8 days; the rank order of proportion of undamaged samples was (C) < (B) < (A). After 11 days of storage, the differences were still apparent. There was less damage in the presence of AIT than in the other treatments. The undamaged fruit proportion at 16 days had decreased most in treatment (B), after which almost all individual fruits stored were damaged regardless of treatment.

The pH and Brix values (data not shown) did not significantly change. Slight decrease in the Brix value in damaged fruits was first observed after 11 days.

Because of elevated variances within treatment, we
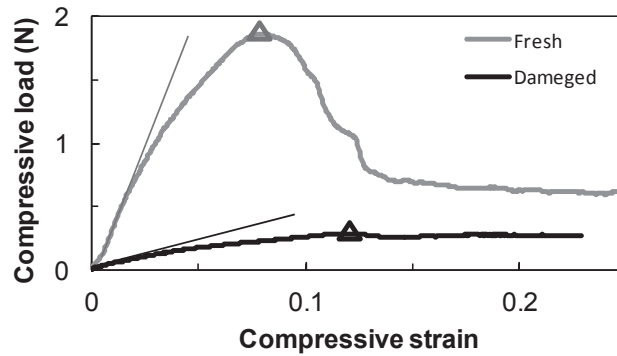
Fig. 1 Typical compression curves for fresh and damaged strawberries.
The equator was compressed with a probe of 3-mm diameter at 1 mm/s.
Triangle symbols indicate the fracture points, and the straight lines are the maximum slope used for calculation of the apparent modulus.
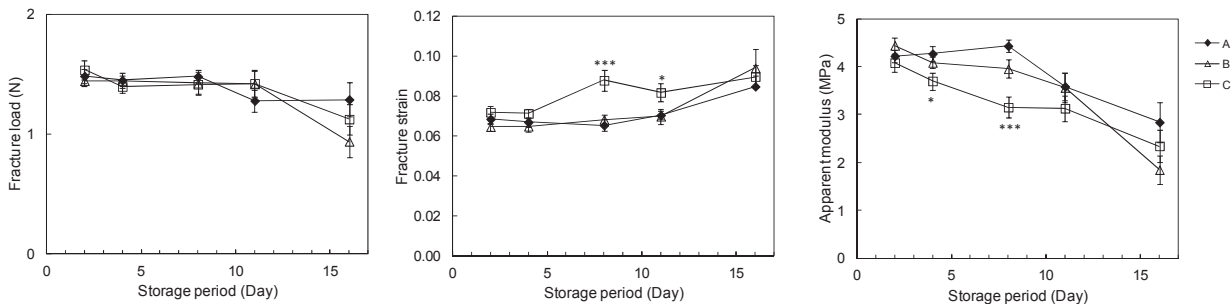
Fig. 2 Changes in the mechanical properties of strawberries during storage under different conditions at 5℃.
Test condition ◆, in a polyethylene bag with AIT release product (A); △, in a similar bag without AIT (B); and □, control without AIT or bag (C). Asterisks beside the symbols indicate significant difference among the three conditions determined by one-way ANOVA (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). The equator was compressed with a probe of 3-mm diameter at 1 mm/s. Values are means and standard errors, n=20.

found no significant experimental effects on the absolute values of fruit weight over the entire storage period (data not shown). We measured the weights of 25 samples on fixed trays under each treatment condition during the test period. The weight losses of samples enclosed in PE bags were very small even though bags were not sealed. Weight loss in (C) without bags was very large (Fig. 4).

The fracture load, which is often used as a softening index, was not suitable for the evaluation of post harvest changes in mechanical characteristics. The values did not differ significantly until 11 days. The apparent modulus and fracture strain were better measures of fruit damage during storage. The differences among the three treatments were most significant at *ca*. 8 days after harvest (Fig. 2), but there were no significant effects in the first few days after harvesting. Damage was evaluated by increasing fracture strain and reducing apparent modulus. The rank order of modulus measures among treatments was (C) < (B) < (A) after 8 days of storage. Damage was significant after 2 weeks of storage under all test conditions. Most of this damage was attributed to the growth of molds, which increased the variance within treatment. By the 16th day of storage, some fruits were undamaged but softened by fungi. Molds damaged strawberry quality. The modulus in treatment (B) was lower than that in (C) because after 16 days and longer storage period, there were fewer molds in treatment (C). The
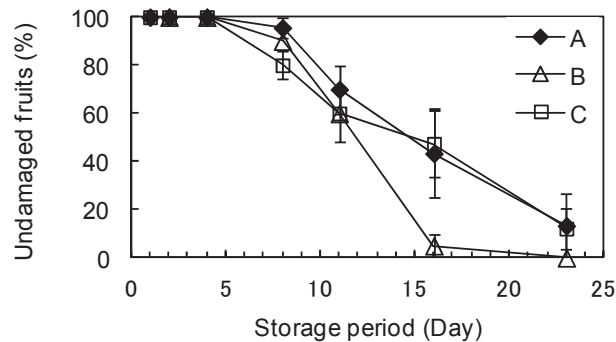
Fig. 3 Ratio of undamaged fruits under different conditions at 5℃.

Test condition ◆, in a polyethylene bag with the AIT release product (A); △, in a similar bag without AIT (B); and □, control without AIT or bag (C). Values are means and standard errors for two or three batches.
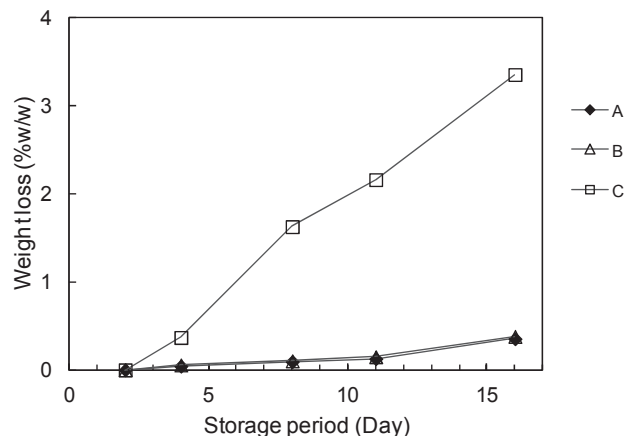
Fig. 4 Weight losses from 25 strawberries in a tray during storage under different treatments at 5℃.

Test condition ◆, in a polyethylene bag with the AIT release product (A); △, in a similar bag without AIT (B); and □, control without AIT and the bag (C).

AIT product was effective through 2 weeks after harvest.

3. Comparison of equator and apex

Strawberry fruits are small and humans do not consume a part of the strawberry. However, the effects of storage may differ in different parts of the fruit, though it is the equatorial part that is usually tested. Figure 5 shows some parameters measured at the equator and apex during storage. The Brix value was much higher (*ca*. 12) at the apex than at the equator (*ca*. 8), but pH (3.5–3.7) did not differ between the two positions (data not shown) through the whole storage period. The apical Brix values decreased with storage time, unlike the equatorial values. The fracture load at the equator was higher than or similar to that at the apex. The fracture strain at the equator was always higher than that at the apex. The tendencies in pH, Brix, and mechanical properties were similar between treatments (A) and (B), in which the rate of deterioration was faster, as stated above. Generally the apex was softer than the equator as indicated by the lower values of the fracture load and strain. The fracture point was not clearly detected in 50% of fruits stored under treatment (C) for 16 days because the strawberry fruits were very soft. The apparent modulus measured at the apex tracked a different trend. The apical modulus was significantly higher than the equatorial modulus in fresh fruits 2, 4 and 8 days after harvest, decreasing steeply with storage time, and reaching the same level as the equatorial modulus by 11 days post harvest; subsequently, both moduli decreased similarly in aged fruits.

Discussion

1. Best quality index

We aimed to develop a new index for strawberry fruit quality post harvest. Palatability is determined by sweetness, which is mainly dependent on sugar content, and influenced by sourness and softness of fruits. Brix, pH, and fracture load values did not significantly change among storage times or treatments. Mean values were not stable and had large standard errors (Figs. 2 and 5). Weight loss without
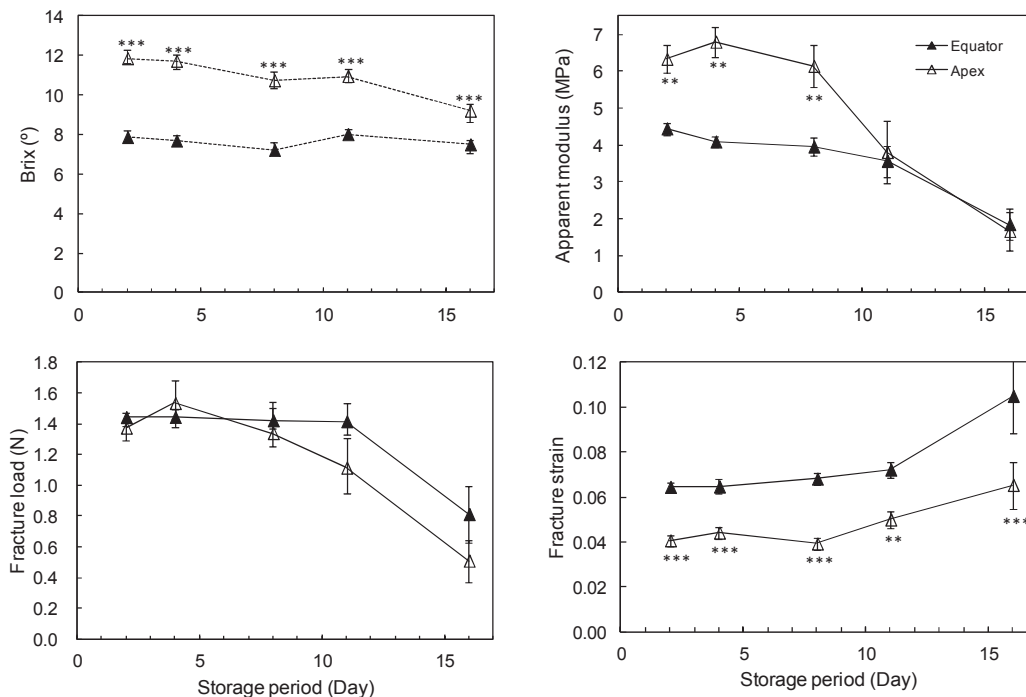
Fig. 5 Differences in Brix and mechanical properties between the fruit equator (closed symbols) and apex (open symbols) during storage at 5℃.

Values are mean and standard errors of 10 individual fruits stored under the treatment (B). Apex symbols with asterisks are significantly different from the equator positions determined by paired *t*-tests (**, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

the PE bag was greater than in other treatments when the same samples were measured repeatedly (Fig. 4). However, the PE bag effect was not significant when different fruits were measured on different days because there were large variations in condition among different fruits. Gunness et al. (2009) emphasized the importance of fruit-to-fruit evaluation for strawberry fruits. Thus, trends observed in mechanical properties were much more significant among treatments and storage times when inter-individual variation was factored out; destructive tests do not allow resampling of the same individuals at different times.

There was also great variation in fruit size, and this was difficult to take into account. We conducted puncture tests with a thin cylinder to reduce the contact area between fruit samples and plunger. The deformation was standardized to strain divided by diameter of each fruit and the stress can be derived when the deformation is enough small as the contact area was only bottom of the plunger.

Among mechanical parameters, the fracture strain increased and the apparent modulus decreased gradually over storage time; however, the fracture load did not change significantly (Fig. 2). The same phenomena are commonly observed in other plant materials, as Thiel and Donald (2000) reported for fresh and aged carrots. A post harvest change was not detected during short-term storage (less than 4 days). Differences among the three treatments were most significant at *ca*. 8 days after harvest (Fig. 2). At that time, the extent of damage measured by increasing the fracture strain and reducing modulus was in the rank order (C) > (B) > (A). Damage became significant after 2 weeks of storage under all treatment conditions.

The decrease in the modulus and increase in the fracture strain (Fig. 2) occurred before visual damage was observed in groups of strawberry fruits stood under the storage conditions (Fig. 3). The threshold for strawberry quality using visual assessment occurred when the proportion of acceptable berries fell to 80% (Wills and Kim, 1995). This occurred after *ca*. 10 days for treatment (A), 9 days for (B) and 8 days for (C) conditions. The apparent modulus and fracture strain changed significantly before these points in time. Thus, mechanical parameters were more sensitive for the detection of undesirable changes in strawberry fruits stored under different conditions than visual assessment. Individual variations among fruits were very large, and we accordingly prefer non-destructive tests because they allow repeated measurements on the same individual fruits. We were able to derive the modulus at approximately 0.02 compressive strain (Fig. 1); hence, modulus would be a good indicator of fruit quality if an inexpensive and portable tester were to be developed. A fruit hardness tester is useful, but only measures a fracture force, which we found inappropriate for evaluating postharvest changes in mechanical characteristics. The fracture load decreased significantly in damaged fruits after a long storage period when the fruits were no longer edible. This is also true for the Brix, which is easily measured, but changes appear too late in the storage period when fruits are no longer suitable for consumption. Parameters used as quality indices should detect differences among treatments early in the storage period.

2. Partial differences in a fruit

Apical parts of the fruits had higher Brix and apparent modulus values, and lower fracture load and strain values than equatorial parts (Fig. 5). Lower values in fracture properties at the apex suggest that fruit damage during storage is likely to start at the apex. Decreasing apparent modulus at the apex occurred earlier in the storage period than in the equatorial part. Modulus at the apex measured through non-destructive procedures that allow detection of changes early in storage may provide an excellent mechanical index of storage quality for strawberry fruits.

3. Effects of storage conditions

Strawberries, which are non-climacteric fruits, produce less ethylene gas than climacteric ones. Under our test conditions, bruising was not significant after handling and transportation, and there was no serious damage during the first 2 days, though damage by fungi appeared to be the greatest problem. Thus, we can conclude that the AIT product was effective in extending the storage period at 5ºC to 2 weeks post harvest. During this period, a low level of AIT (<1 ppm) was detected in the atmosphere (Oshida et al., 2010). The manufacturer (Ageless Service Center) claims that the product is effective in prolonging the storage lives (up to 14 days) of some non-climacteric fruits, such as strawberries and grapes. Preservative effects were evaluated by the subjective appearance of fruits, but no objective indices were reported. Firmness, as measured by a fruit tester, acidity, and sugar content were not affected by the

product.

In our study, the AIT effects most likely ended at 16 days because the undamaged fruit proportion in treatment (A) had fallen to the level in the control (C), though it was still higher than in treatment (B). Humidity in the PE bag was higher than in the control (C), as indicated by reduced weight loss in the fruits (Fig. 4); however, molds may have grown more rapidly in the bags after the first appearance. The higher moisture loss in treatment (C) than in treatment (B) may reflect the greater values of the apparent modulus and fracture properties at 16 days in (C). Drying of fresh fruits may result in a high modulus, but it is an unfavorable effect, and this should be taken into account when a mechanical property is used as a quality index.

4. Effects of AIT on strawberries

Ripening of non-climacteric fruits is not accelerated by ethylene (Kader, 1990; Shimokawa, 1990). However, some researchers reported that ethylene exposure increased the softening of strawberries (Bower et al., 2003; Tian et al., 2000; Wills and Kim, 1995). As AIT inhibits 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, which produces ethylene, the ripening and senescence of vegetables and fruits are retarded (Shimokawa, 1990). The ripening mechanism of strawberries has not been clarified and the effects of ethylene on ripening are still controversial (Iannetta et al., 2006; Trainotti et al., 2005).

The mechanism by which AIT acts has not yet been determined. We did not test a high concentration of AIT because the strong and undesirable smell of wasabi adhered to the strawberries when AIT concentration exceeded 1 ppm. Consumers never accept such fruits, though they are fresh, because strawberry fruits and wasabi flavors are quite incongruent. We postulate that the AIT release product most probably prevented fungal growth since no molds were found over the 2-week storage period post harvest at 5℃. Further study is required to clarify the mechanism by simultaneous analysis for AIT quantity and sample damage.

5. Application study

The variety *Yayoihime* can be harvested in March, and the fruit characteristics are excellent; the fruits are firm and have a long storage life. Different varieties and/or different geographical regions and times should be tested before practical application of the method presented here.

Conclusions

The apparent modulus and fracture strain, two mechanical parameters obtained by simple compression testing, measured the softening of strawberry fruits. The modulus decreased and strain increased, but other parameters, such as the fracture load, pH, and Brix, did not significantly change with time after harvest. The presence of the AIT release product and storage in PE bags clearly extended the period before softening from several days to 2 weeks in cold storage. The proposed modulus has good potential as an indicator of fruit damage because it is more sensitive than other parameters and is obtained by a non-destructive compression test.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Megumi Yuyama and Mr. Toshio Komatsu of Ageless Service Center Ltd., for providing samples. This work was partly supported by the program for the Breeding and Integrated Research toward Enhancing Consumption of Domestic Farm Products in Food Service Industry from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 2006–2010.

References

1) American Society of Agricultural Engineers, 2000. ASAE S368.3: Compression test of food materials of convex shape. ASAE Standards 2000, ASAE, St. Joseph, MI, pp. 566–572.
2) Arce-Lopera, C., Masuda, T., Kimura, A., Wada, Y., Okajima, K. 2012. Luminance distribution modifies the perceived freshness of strawberries. i-Perception 3(5), 338–355.
3) Bower, J.H., Biasi, W.V., Mitcham, E.J., 2003. Effects of ethylene and 1-MCP on the quality and storage life of strawberries. Postharv. Biol. Technol. 28, 417–423.
4) Calviño, A.M., García-Medina, M.R., Cometto-Muñiz, J.E., Rodríguez, M.B., 1993. Perception of sweetness and bitterness in different vehicles. Percept. Psychophys. 54, 751–758.
5) Caner, C., Aday, M.S., Demir, M., 2008. Extending the quality of fresh strawberries by equilibrium modified

atmosphere packaging. Eur. Food Res. Technol. 227, 1575–1583.

6) Clark, R., 2002. Influence of hydrocolloids on flavor release and sensory instrumental correlations. in: Williams, P.A., Phillips, G.O., (Eds.), Gums and Stabilisers: For the Food Industry 11. Royal Society of Chemistry, London, pp. 217–225.

7) Cook, D.J., Hollowood, T.A., Linforth, R.S.T., Taylor, A.J., 2003. Oral shear stress predicts flavor perception in viscous solutions. Chem. Senses 28, 11–23.

8) Døving, A., Måge, F., 2002. Methods of testing strawberry fruit firmness. Acta Agric. Scand. Sect. B. 52, 43–51.

9) Døving, A., Måge, F., Vestrheim, S., 2005. Methods for testing strawberry fruit firmness: a review. Small Fruits Review 4, 11–34.

10) Goi, H., Inouye, S., Iwanami, Y., 1985. Antifungal activity of powdery black mustard, powdery wasabi (Japanese Horseradish) and allyl isothiocyanate by gaseous contact. —Antifungal activity of plant volatiles—. J. Antibact. Antifung. Agents 13, 199–204.

11) Gunness, P., Kravchun, O., Nottingham, S.M., D'Arcy, B.R., Gidley, M.J., 2009. Sensory analysis of individual strawberry fruit and comparison with instrumental analysis. Postharv. Biol. Technol. 52, 164–172.

12) Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M.J., Gavara, R., 2006. Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*). Postharv. Biol. Technol. 39, 247–253.

13) Hietaranta, T., Linna, M.M., 1999. Penetrometric measurement of strawberry fruit firmness: device testing. Hort Technol. 9, 103–105.

14) Iannetta, P.P.M., Laarhoven, L.J., Medina-Escobar, N., James, E.K., McManus, M.T., Davies, H.V., Harren, F.J.M., 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. Physiol. Plantarum 127, 247–259.

15) Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., Hiba, S., 1992. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. Biosci. Biotech. Biochem. 56, 1476–1477.

16) Kader, A.A., 1990. Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. In "The Strawberry into the 21st Century", ed. Dale, A. and Luby, J.J., Timber Press, Portland, pp.145–152.

17) Kanemaru, K., Miyamoto, T., 1990. Inhibitory effects on the growth of several bacteria by brown mustard and allyl isothicyanate. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 37, 823–829.

18) Khosroshahi, M.R.Z., Esna-Ashari, M., Ershadi, A., 2007. Effect of exogenous putrescine on post-harvest life of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruit, cultivar Selva. Sci. Hort. 114, 27–32.

19) Nunes, M.C.N., Brecht, J.K., Morais, A.M.M.B., Sargent, S.A., 2006. Physicochemical changes during strawberry development in the field compared with those that occur in harvested fruit during storage. J. Sci. Food Agric. 86, 180–190.

20) Oshida, Y., Oikawa, K., Yuyama, M., Yamazaki, H., 2010. A freshness preserving agent for food and method for preserving freshness. Japan Kokai Tokkyo Koho, 2010-57382. Mar. 18.

21) Péneau, S., Brockhoff, P.B., Escher, F., Nuessli, J., 2007. A comprehensive approach to evaluate the freshness of strawberries and carrots. Postharv. Biol. Technol. 45, 20–29.

22) Sekiyama, Y., 2009. Utilization of mustard and hop extract agents. in: Izumi, H. (Ed.), Handbook of Quality and Hygiene Management of Cut Vegetables, Science Forum, Tokyo, pp. 243–251 (in Japanese).

23) Shimokawa, K., 1990. Allylisothiocyannate, its role in ethylene action. Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ. 37, 195–201.

24) Takagi, S., Naito, S., 1993. Freshness preservers and method for preserving freshness using them. Japan Kokai Tokkyo Koho, 93-49394. Mar. 2.

25) Tatsuki, M., 2007. Ethylene regulation of fruit ripening and senescence. Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci. 6, 11–22 (in Japanese).

26) Tian, M.S., Prakash, S., Elgar, H.J., Young, H., Burmeister, D.M., Ross, G.S., 2000. Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. Plant Growth Regulation 32, 83–90.

27) Thiel, B.L., Donald, A.M., 2000. Microstructural failure mechanisms in cooked and aged carrots. J. Texture Stud. 31, 437–455.

28) Trainotti, L., Pavanello, A., Casadoro, G., 2005. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment

imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? J. Exp. Bot. 56, 2037–2046.
29) Wills, R.B.H., 1998. Enhancement of senescence in non-climacteric fruit and vegetables by low ethylene levels. Acta Horticulturae 464, 159–162.
30) Wills, R.B.H., Kim, G.H., 1995. Effect of ethylene on postharvest life of strawberries. Postharv. Biol. Technol. 6, 249–255.

イチゴ果実の貯蔵中の品質を示す簡易な力学指標

神山　かおる[*§]，増田　知尋[**]，島田　宏美[*]，田中　敏江[*]，和田　有史[**]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品機能研究領域
[*] 食品物性ユニット，[**] 食認知科学ユニット
〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12

要　旨

イチゴの貯蔵中の品質を示す圧縮試験で求められる簡単な力学指標を提案する．力学的変数に対する５℃における異なる貯蔵条件の効果を試験した．イチゴの貯蔵条件としては，袋なしのコントロール，ポリエチレン袋内に入れたもの，ポリエチレン袋内にアリルイソチアシアネート（AIT）を蒸散させる製剤入りの系を比較した．気化したAITは微生物の成長を抑制することが知られているからである．一般に果実硬度として用いられる破壊荷重は，有意差が認められなかったが，貯蔵時間が長くなると破壊歪の増加，見かけの弾性率の減少が認められた．イチゴ果実の劣化に対して感度が高く，非破壊試験の可能性がある小さい歪領域で計算されることから，見かけの弾性率はよい指標であることが示された。

キーワード：イチゴ，圧縮試験，見かけの弾性率，力学特性，低温保存

研究ノート

Composition and Pepsin Digestibility of Proteins Extracted from Microground Particles in Cooked Bean Paste (*Ann*)

Michiko Momma§

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

In Japan, common beans are often processed to a cooked bean paste (*Ann*) for confectionary and bakery use. It is known that processing the beans to *Ann* paste causes formation of cell particles called *Ann* particles, which are highly resistant to human digestion. In this study, we microground freeze-dried *Ann* paste by using a jet mill; subsequently, proteins extracted from the cell particles were examined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and pepsin assays. The micrographs of *Ann* particles showed that they had been thoroughly disintegrated by the microgrinding process. The SDS-PAGE profile indicated that several polypeptides, including the acidic and the basic subunits of legumin, had been extracted from the microground *Ann* particles. The microground *Ann* particles had a low concentration of phaseolin, which is one of the major proteins found in common beans and is present in higher quantities in bean flour. Among the proteins, polypeptides that were presumably derived from legumin subunits showed significant resistance to pepsin. These results suggested that the traditional method of bean paste cooking is associated with the formation of *Ann* particles that trap pepsin-resistant polypeptides.

Key words: *Ann* particle, white common bean, legumin, pepsin-resistant protein, micro grinding
Abbreviations: SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Introduction

Among a wide variety of plant-derived foods, beans are one of the most important sources of human nutrition worldwide. Beans have a high protein content, low fat and sodium content, and are a good source of fiber, minerals, vitamins, and polyphenol antioxidants. However, in general, bean proteins have a low nutritional value because of their lower digestibility and deficiency in one or more essential amino acids[1, 2]. It is also known that heat processing of whole beans causes formation of cellular particles that are resistant to digestion in humans[3].

Previous studies have shown that phaseolin, the major storage protein in many common beans, is highly resistant to gastric enzymes in its native form, although its digestibility can be remarkably improved by prior heating[4, 5]. In our previous studies, we found that the basic subunit of legumin remained highly tolerant to pepsin digestion even after extensive heat processing and several enzymatic treatments[6, 7]. Legumin, one of the major storage proteins found in many legumes, had not been detected in common beans for a long time[8]. The tolerance of proteins to pepsin digestion could cause concerns because it is considered to reflect the possible risk of allergenicity[9]. In our previous study, the basic subunit of legumin was not detected in

§Corresponding author. Phone: +81－29－838－8004, Fax: +81－29－838－7996
e-mail: michiko@affrc.go.jp

bean pastes prepared from whole beans, the cooking of which generates *Ann* particles during heat processing[10]. To elucidate the protein association of *Ann* particles, we prepared *Ann* paste from common beans through traditional Japanese cooking procedures, followed by freeze-drying and microgrinding of the paste. Then, proteins were extracted from the *Ann* particles and were examined by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and pepsin digestion assays.

Materials and Methods

Preparation and microgrinding of freeze-dried *Ann* paste

Ann paste was prepared from the white common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Yukitebou), as described earlier[10]. Freeze-dried *Ann*-paste powder was microground using a jet mill (CO-JET system α, Seishin, Tokyo).

SDS-PAGE analysis

For SDS-PAGE analysis, proteins were extracted from 50 mg of each freeze-dried *Ann*-paste and its microground flour by using 500 μL sample buffer (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) and boiled for 5 min. SDS-PAGE samples (10 μL), as well as extracts from bean flour (0.5 μg protein), were loaded onto a 5% to 20% polyacrylamide precast gel (NPG 520, Atto) and electrophoresed at 20 mA for 90 min. The resultant gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB R-250).

Pepsin digestion assay

Distilled water was added at 10 times (v/w) to 3 g of flour. The mixture was then homogenized using a Hiscotron homogenizer (NS-50, Nichi-On) for 1 min at 10,000 rpm. After centrifugation at 8,000 g for 20 min, the supernatant was collected and the protein concentration of the extracts was estimated using the microassay procedure with a protein assay reagent (BioRad). *In vitro* pepsin digestibility of the extracted protein was examined by using the method put forth by Astwood *et al*. (1996). The protein extracts were incubated in simulated gastric fluid (SGF, 0.32% pepsin from a porcine stomach [3300 U/mg, Wako], 30 mM NaCl, pH 1.2) for 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 15, or 60 min. SDS-PAGE samples were loaded onto a 5% to 20% polyacrylamide precast gel (Atto NPG 520) and electrophoresed at 20 mA for 90 min. The resultant gel was stained with silver staining methods (Silver Stain Plus, BioRad).

Results and Discussion

Protein composition of traditionally cooked and microground *Ann* paste

Ann paste prepared from common beans was found to be composed of particles derived from cotyledonary cells, which is similar to the findings of our previous study[10]. Since the preparation procedure for *Ann* paste included several rinsing steps, the background of the micrograph was clear of cell debris (Fig. 1 A). The *Ann* particles appeared to be thoroughly disintegrated by the microgrinding process, and their internal material was dispersed as shown in Fig. 1 B.
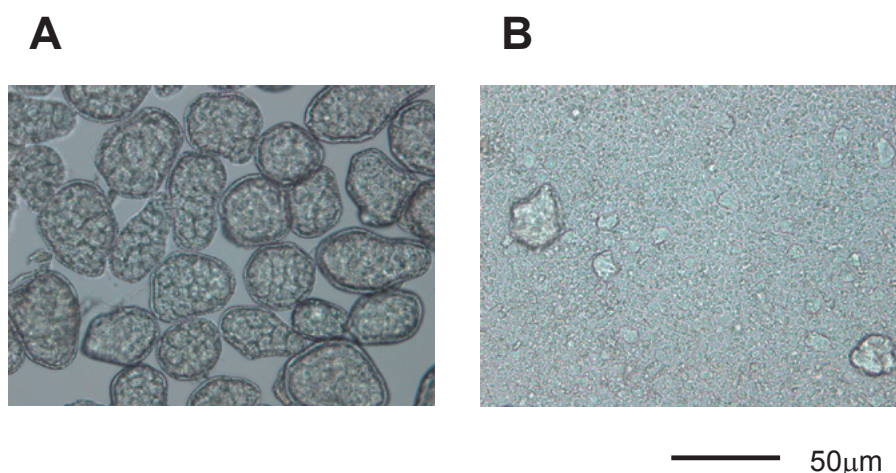
Fig. 1 Micrographs of *Ann*-paste preparation (left) and microground *Ann* particles (Right)

The SDS-PAGE profile (Fig. 2) indicated that the protein composition of microground *Ann* particles (*Ann* MP) was different from that of bean flour and the *Ann*-paste preparation (*Ann*). While small amounts of protein were extracted from intact *Ann* particles, several evident bands, including the ones representing legumin, were observed in the extract from microground *Ann* particles. Compared to bean flour, the microground *Ann* particles had lower concentrations of phaseolin and lectin, which are major proteins in common beans. The polypeptide with a molecular weight of 50 kDa was found to be the acidic subunit of legumin, determined with the help of previous studies[6, 8].

As mentioned earlier, legumin had not been detected in bean pastes prepared from whole beans, the cooking of which generates *Ann* particles during heat processing[10]. In the current study, acidic and basic subunits of legumin and several other polypeptides associated with *Ann* particles were detected. Noah *et al*. (1998) reported that approximately 17% of starch in the cotyledonary cell particles of cooked beans is a resistant type of starch and remains in the human ileum 3 h after ingestion[3]. Hence, we think that considerable amounts of proteins rich in legumin are “trapped” within the *Ann* particles, which are encapsulated by pepsin-resistant carbohydrates that are formed during the cooking procedure.

Fig. 2 SDS-PAGE profile of bean flour, *Ann* paste, and microground *Ann*-paste powder

M: molecular weight marker; FL, bean flour; Ann, *Ann* paste preparation; *Ann* MP, microground *Ann* particles.
The bands marked Pha, Lec, LgA and LgB indicate phaseolin, lectin, and acidic and basic subunits of legumin, respectively.

Pepsin digestibility of proteins in the microground powder of *Ann*-paste particles

Proteins extracted from the microground *Ann* particles were analyzed by pepsin-digestibility assays (Fig. 3). Two bands (indicated by * and ** in Fig. 3) were found to be remarkably tolerant to the pepsin digestion. Although the use of a molecular weight marker different from the one used in SDS-PAGE caused discrepancies in the estimation of molecular weights, the polypeptides with higher molecular weight (*) were estimated to be those derived from storage proteins (phaseolin and the acidic subunit of legumin) in common beans, judging from preliminary experiments (data not shown). Since it is known that phaseolin becomes susceptible to digestive enzymes after heat processing[4, 5], the resistant polypeptide was ascertained to be the acidic subunit of legumin. The smaller polypeptide (**), which is believed to be the basic subunit of legumin, showed

Fig. 3 Pepsin-digestibility assay results for proteins extracted from microground *Ann*-paste powder

MW, molecular weight marker; C, microground *Ann* particles without enzymatic treatment. The protein extracts were incubated in for 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 15, or 60 min. The marks on the right indicate phaseolin and the acidic subunit of legmin (*) and basic subunits of legumin (**).

significant tolerance to pepsin digestion.

It is considered that substantial nutritional losses occur while cooking bean paste because of the formation of indigestible granules[3]. It has also been presumed that bean paste cooking could prevent exposure to a pepsin-resistant protein, which is a possible allergen in common beans, during ingestion[10]. The results of the current study supported this in that they indicated that proteins, including the pepsin-resistant legumin subunit associated with *Ann* particles, are presumably trapped within the particles. These proteins likely aggregate or interact with other components during the extensive heat processing[11, 12].

Common beans are one of the most important sources of human nutrition, and their novel health benefits are drawing attention[13]. Further studies on the behavior and interaction of bean proteins and their other nutritional components such as carbohydrates would be necessary for more efficient use of common beans as food.

Acknowledgments

We deeply appreciate the kind cooperation extended by Dr. Kiyoshi Ohba and Dr. Keiko Sasaki of the Hokkaido Tokachi Area Regional Food Processing Technology Center and we thank them for providing the freeze-dried preparation of *Ann* paste. Microgrinding of the freeze-dried *Ann* paste was performed at the food processing laboratory of National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO).

References

1) Porzucek, H., Larsson-Raznikiewicz, M. and Miroslawa Klepacka. (1991). *In vitro* protein digestibility of flours and protein isolates form seeds of some Leguminous plants. *Swedish J. Agric. Res.*, **21**, 49-53.

2) Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources: a review. *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 6-29.

3) Noah, L., Guillon, F., Bouchet, B., Bulleon, A., Molis, C., Gratas, M., Champ, M. (1998). Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans. *J. Nutri.*, **128**, 977-985.

4) Despande, S.S. and Nielsen, S.S. (1987). *In Vitro* enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris L. Journal of Food Science.*, **52**, 1326-1329.

5) Nielsen, S. S., Deshpande, S. S., Hermodson, M. A. and Scott, M. P. (1988). Comparative digestibility of legume storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 896-902.

6) Momma, M. (2006). A pepsin resistant 20 kDa protein found in red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was identified as basic subunit of legumin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 3058-3061.

7) Momma, M. (2007). *In vitro* protein digestibility of flours and cooked pastes prepared from white common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Yukitebou). *Food Science and Technology Research*, **13**, 166-168.

8) Muhling, M., Gilroy, J. and Croy, Ronald R.D. (1997). Legumin Proteins from Seeds of *Phaseolus Vulgaris L. J.Plant Physiol.*, **150**, 489-492.

9) Astwood, J. D., Leach, J. N. and Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech.*, **14**, 1269-1273.

10) Momma, M. Sasaki, K., Ohba, K., Isobe, S. (2012). Effect of cooking procedure and roasting on the protein composition and *in vitro* digestibility of common bean proteins. *Rep. Nat'l Food Res. Inst.*, **76**, 17-22.

11) Carbonaro, M., Nicoli, S. and Musci, G.(1999). Heat-induced Aggregation of Phaseolus vulgaris L. Proteins: An electron spin resonance study. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2188-2192.

12) Venkatachalam, M. and Sathe, S. K. (2003). Phaseolin *in vitro* pepsin digestibility: Role of acids and phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3466-3472.

13) Gallegos-Infante, J.-A., Bello-Perez, A. B., Rocha-Guzmann. E., Gonzalez-Laredo, R. F. and Avila-Ontiveros, M. (2010). Effect of the addition of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour on the *in vitro* digestibility of starch and indigestible carbohydrates in spaghetti. *J. Food Sci.*, **75**, 151-156.

いんげん豆あん粒子中のたんぱく質組成ならびに そのペプシン消化耐性について

門間　美千子

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

要　約

いんげん豆はあん等，全粒で加熱加工し，菓子やパン等に利用されることが多い．いんげん豆を全粒加熱したとき，細胞由来の難消化性の粒子が形成されるとともにペプシン抵抗性のレグミン塩基性サブユニットが検出されなくなることが明らかとなっている．本報告では，凍結乾燥したあんをジェットミルで微粉砕し，内部に含有されるたんぱく質組成を調べた．あん粒子微粉砕物からはレグミン塩基性サブユニットを含む数種類以上のポリペプチドが抽出され，その組成はいんげん豆たんぱく質とは異なり，主要たんぱく質であるファゼオリンの含有量が低かった．あん粒子から抽出したたんぱく質のペプシン消化性を測定したところレグミンサブユニットに由来すると見られるポリペプチドが高いペプシン抵抗性を示した．以上のことから，いんげん豆を全粒で加工するとペプシン消化耐性たんぱく質を包含する粒子が形成されることが示された．

研究ノート

精米工程が異なる米に対するコクゾウムシの選択性と産卵選好性

古井　聡[§]，今村　太郎，宮ノ下　明大

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

Selectivity and oviposition preference of the maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) for brown rice, polished rice and rinse-free rice

Satoshi Furui, Taro Imamura, Akihiro Miyanoshita

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 305-8642

Abstract

The selectivity and the oviposition preference of the maize weevils for brown rice, polished rice and rinse-free rice (the superior rice made by removing the bran, surface starch and residue from the polished rice that does not require rinsing, Musenmai) were evaluated. These indexes showed the same tendency in the following oders : brown rice > polished rice > rinse-free rice. Thus, the rinse-free rice was found to be the smallest risk for weevil infestation, in this study.

緒　言

コクゾウムシ *Sitophilus zeamais* Motschulsky（コウチュウ目：オサゾウムシ科）はデンプンの貯蔵庫である穀類およびその加工品を食害する昆虫であり，世界各国で被害が報告されている．貯穀害虫に食害された穀類を摂取して健康被害に及んだ事例はほとんどないが，被害の程度により本来の食味や食感が大きく損なわれる例が報告されている[1)]．法的な側面では，食品衛生法　第６条４号において，“不潔，異物の混入又は添加その他の事由により，人の健康を損なうおそれのあるもの”が食品に混入してはならないことが定められており，動物性異物もこの範疇にある[2)]．また，一般消費者は食品に混入した昆虫に対して不快感や嫌悪感を示すため，クレーム件数の多い異物とされている[3)]．従って，貯穀害虫の食害リスクを軽減するためには，まず誘因・繁殖に係る習性を明らかにすることが極めて重要となる．

我が国で主食として位置づけられている米は，通常収穫期である秋に刈り取られた籾を乾燥後，籾殻部分を取り除いた玄米の形態で貯蔵や移送を行う[4)]．食用米の小売り販売形態は，玄米や，玄米を搗精して米糠部分を取り除いた白米が代表的であるが，これらのうち白米には精米時に残った糠が周りに付着しているため，食味を良くする目的で糠を水洗・除去して炊飯する．近年，白米から糠を取り除く処理を行ったいわゆる無洗米も販売されており，糠成分の酸化による食味

[§] 連絡先，satfurui＠affrc.go.jp

低下が抑えられるだけでなく，水洗の手間が省ける，とぎ汁として糠を下水へ流すことによる環境負荷を抑えられるなどの利点があるため利用拡大が進んでいる[5, 6]．コクゾウムシが白米よりも玄米を良く選択し，産卵することは既に報告されている[7−9]が，無洗米に関しては報告がない．

そこで本研究では，精米工程が異なる玄米，白米，無洗米を用いてコクゾウムシ成虫の選択性を調べると共に，産卵選好性について明らかにすることを目的とした．

実験材料及び方法

1．供試虫と飼育条件

供試虫は（独）農研機構　食品総合研究所において20年以上玄米で継代飼育されている系統を使用した．精米工程が異なる米として，市販の平成23年度産　茨城県産コシヒカリの玄米，白米，無洗米をそれぞれ購入し，本試験に供した．飼育には，通気性を確保するため，全てフタの上部に70メッシュの真鍮製通気網を設けたポリスチレン製飼育容器を使用した[10]．本試験に供試したコクゾウムシは玄米を試料として温度25℃，湿度70％，全暗（立ち入り時のみ点灯）の条件で飼育し，成虫出現後１～２週経過した個体を，選択試験に供する前日までに実体顕微鏡下で雄と雌に分けた．分けた個体は玄米を少量入れた飼育容器でそれぞれ飼育した．

2．選択試験および産卵選好性試験

選択試験の概要は，図１．に示した．選択試験および産卵選好性試験は，温度27℃，湿度70％，明暗条件16時間点灯８時間消灯の条件で行った．

コクゾウムシの選択試験を実施する前に，飼育時に用いた玄米の影響を抑える目的で，試験１回あたり雄と雌に分けたコクゾウムシ成虫をそれぞれ25頭ずつ無作為に選択し，直径60 mmの円筒形飼育容器に入れ（計50頭），１時間静置した．１時間静置後，無洗米，白米，玄米の組み合わせを１組として，直径60 mmの選択試験用円筒形容器に各20 g入れ，コクゾウムシが移動できるように直径11 mmの穴を開けたフタをして
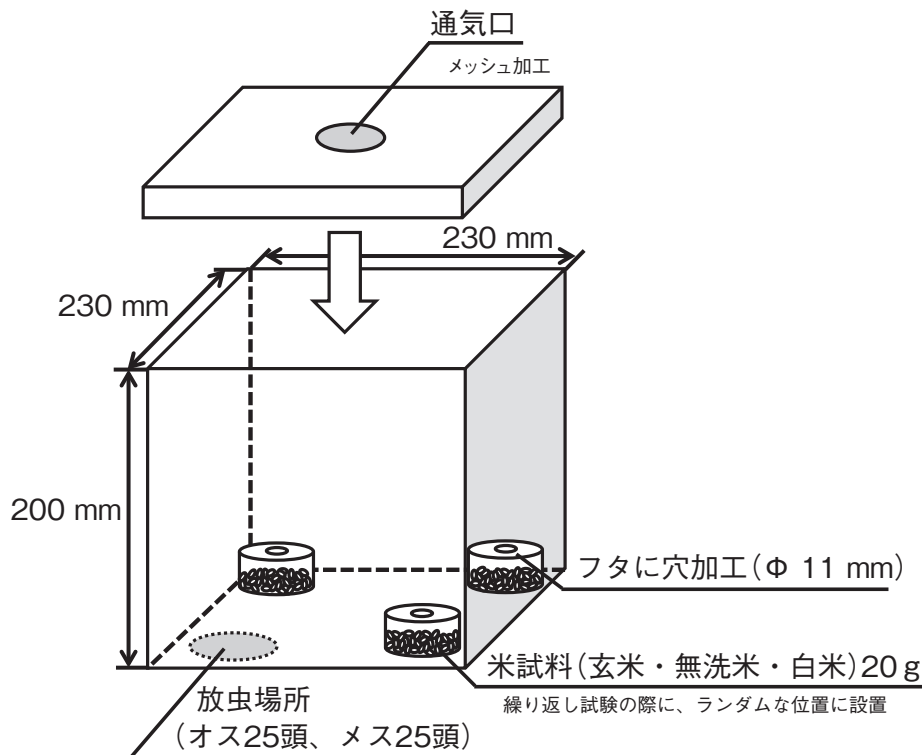
図１．コクゾウムシ選択試験の方法

縦・横230 mm，高さ200 mmの直方体容器の３隅にランダムに静置した．容器を設置しない隅から，コクゾウムシ50頭を放虫し，48時間後に直方体容器からコクゾウムシの選択試験用容器を回収して存在する成虫数を調べた．試験は25回反復実施した．

産卵選好性試験は，選択試験でコクゾウムシを回収した後，無洗米，白米，玄米の入った選択試験用の円筒形容器の穴が空いたフタを飼育容器のフタに代え，温度27℃，湿度70％，明暗条件16時間点灯８時間消灯の条件で約２ヶ月間飼育し，それぞれの試料から羽化した成虫の数を調べた．

選択性試験・産卵選好性試験で得られたコクゾウムシの頭数は，共にTurkeyの多重比較検定法を用いて検定した．

結果と考察

選択試験

選択試験の開始から24時間後までは，選択試験用容器の隅に固まっていずれの米も選択しないコクゾウムシも数多く認められたが，放虫後48時間後にはほとんどがいずれかの米を選択した．その結果を表１．に示す．25回行った反復試験において，無洗米を選択したコクゾウムシは１試験あたり平均6.9頭が認められ，最少で０頭，最多で23頭であった．同様に，白米を選択したコクゾウムシは平均15頭で，０～42頭の範囲であり，玄米を選択したコクゾウムシは平均26頭で，３～45頭であった．平均値で単純比較すると玄米を選択したコクゾウムシは無洗米の約3.8倍，白米の約1.7倍であった．また，コクゾウムシの総数から計算すると，過半数以上の個体（52％）が玄米を選択していた．Turkey法による多重比較検定を実施したところ，無洗米と白米との間では有意水準５％で有意差が認められ，無洗米と玄米，白米と玄米との間には，１％，５％で有意差が認められた．

白米と玄米のみを選択試験に用いた際には，玄米がコクゾウムシの被害を受けやすいことが既に明らかにされている[11]．本実験でも同様の傾向が示されたが，一部については，無洗米や白米を玄米よりも多く選択した結果も見られた．無洗米と白米に対する誘引効果については玄米ほど顕著でなかったが，無洗米よりも白米を選択することに有意差が認められた.無洗米は，白米から糠を除去したものであるため，コクゾウムシの誘引物質である低級脂肪酸，ラクトン，フェニルメチルアルコールを含む糠が白米に若干付着しているが[12]，糠成分は最も選択性の高い玄米の表層部分を削り取ったものである．このため，玄米に特有の画分に由来する誘引成分が残存している白米が無洗米よりも選択されやすかった可能性がある．

産卵選好性試験

コクゾウムシ成虫は卵を米の内部に産むため，試験試料から卵を回収して生まれた卵の数を比較することは困難である．そこで，産卵された米から羽化した成虫数を調べることで産卵選好性試験を実施した．その結果を表２．に示す．

表１．精米工程の異なる米に対するコクゾウムシ成虫の選択性

	無洗米	白　米	玄　米	未選択
平均頭数±標準誤差	6.9±1.5^a	15±2.6^b	26±2.8^c	1.5±0.37
（最少頭数・最大頭数）	(0−23)	(0−42)	(3−45)	(0−7)

選択性試験は25回の反復で実施した．記号a/b及びb/c間には，Tukeyの多重比較検定で有意水準0.05で有意差が認められた．記号a/c間には，有意水準0.01で有意差が認められた．

表２．精米工程の異なる米に対するコクゾウムシの産卵選好性

	無洗米^a	白　米^a	玄　米^b
平均頭数±標準誤差	2.1±1.4	4.1±1.2	58±7.0
（最少頭数・最大頭数）	(0−30)	(0−19)	(8−124)

産卵選好性試験は25回の反復で実施した．異なる記号間は，Tukeyの多重比較検定により有意水準0.05で有意差が認められた．同じ記号間には有意差が認められなかった．

無洗米から羽化したコクゾウムシは，０～30頭であり，平均は2.1頭であった．白米から羽化したコクゾウムシは０～19頭であり，平均は4.1頭であった．玄米から羽化したコクゾウムシは８～124頭であり，平均値は58頭であった．得られた平均値で比較すると，コクゾウムシの玄米に対する産卵選好性は無洗米の約28倍，白米の約14倍であった．選択試験と同様に，Turkey法で多重比較検定を行ったところ，無洗米と白米との間では有意差が認められず，無洗米と玄米，白米と玄米との間には，共に５％で有意差が認められた．

コクゾウムシの産卵選好については，新垣らが同様の封じ込め実験を行って，白米よりも玄米を選好することが示され[13]，胚芽部に含まれる産卵選好物質として，フェルラ酸エステル，リノレン酸，パルチミン酸，ステロール類が報告されている[14]．本研究においても，玄米からの羽化の頻度や発生数は白米より明瞭に多いことが統計学的にも確認された．加えて，白米は無洗米よりも平均で約２倍高い発生頭数が認められると共に，発生頭数０の頻度も少なく，産卵選好性が若干高い傾向が認められた．これは，表１．で示した選択試験の結果と同様に，白米には玄米の胚芽部分を多く含む糠がコクゾウムシの産卵選好物質として若干付着しているために白米の産卵選好性が高い結果が得られたのではないかと考えられるが，データに有意な差は確認できなかった．

選択性と産卵選好性の相互関係

コクゾウムシの選択性と産卵選好性を比較したところ，より多くコクゾウムシが選択した米からは，より多くの成虫が得られる傾向が認められた．しかしながら，コクゾウムシが比較的多く無洗米や白米を選択した際にも，これらの産卵選好性は低いため，羽化したコクゾウムシは少なくなる傾向が認められた．また，これとは逆に，玄米を選択したコクゾウムシが比較的少ない場合においても，玄米の産卵選好性が高いためか，成虫の発生数が多い傾向が認められた（データは示さない）．白米，無洗米については玄米のように高い産卵選好性が認められないため，例えコクゾウムシがこれらを選択したとしても，玄米よりも次世代の加害を受けにくいと考えられた．

要　約

精米工程の異なる無洗米，白米，玄米について，コクゾウムシの選択性および産卵選好性を閉鎖系の試験で調べたところ，加害リスクは共に玄米＞白米＞無洗米の順であった．本試験の結果から，コクゾウムシの加害リスクは無洗米が最も低いことが明らかとなった．

引用文献

１）Smith, L. W. Jr., Pratt, J. J. Jr., Nii, I. and Umina, A. P. , Baking and taste properties of bread made from hard wheat flour infested with species of *Tribolium*, *Trogoderma* and *Oryzaephilus*., J. Stored Prod. Res., **6**, 307-316,（1971）

２）食品衛生法．（昭和二十二年十二月二十四日法律第二百三十三号）最終改正：平成二一年六月五日法律第四九号．http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S22/S22HO233.html

３）加藤敦之，笹岡秀毅，秋田大助．食品混入非金属異物の検出技術の開発．Sanitation Review, **23**, 48-54,（2005）

４）米の品質と貯蔵，利用．農林省　食糧研究所　食糧技術普及シリーズ，**7**，p. 75-77,（1969）

５）鈴木敬子，無洗米，普通米の製造・利用におけるライフサイクルCO_2排出量，日本調理科学会誌，**42**, 342-348,（2009）

６）鈴木敬子，米の加工利用（4）無洗米，食料と容器，**52**, 667-673,（2011）

７）高橋　奨，米穀の害虫と駆除予防，明文堂，p. 202,（1931）

８）原田豊秋，食糧害虫の生態と防除，光琳書院，p. 526,（1971）

９）Takahashi, F., and Mizuno H., Infestation of rice weevils in rice grain in relation to drying procedures after harvest and the form of the at differen t stages in the milling process., Environ. Control in Biol. **20**, 9-16,（1982）

10）今村太郎，宮ノ下明大.，貯蔵食品を加害する蛾類の飼育法，ペストロジー，**24**, 71-73,（2009）

11）Honda, H., Yamamoto, I. and Yamamoto, R., Attractant for rice weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleptera:Rhynchophoridae), from rice grains I. Bioassay method for the attractancy of rice grains to rice weevils., Appl. Entomol. Zool., **4**, 23-31,（1982）

12）Honda, H., Yamamoto, I. and Yamamoto, R., Attractant for rice weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky

(Coleptera:Rhynchophoridae), from rice grains II. Fractionation of rice and the nature of the crude attractive fraction., Appl. Entomol. Zool., **4**, 32-41, (1982)

13) 新垣則雄，高橋史樹．，コクゾウの白米と玄米に対する産卵選好．，日本応用動物昆虫学会誌，**26**, 166-171, (1982)

14) Maeshima, K., Hayashi, N., Murakami, T., Takahashi, F. and Komae, H.,Identification of chemical oviposition stimulants from rice grain for *Sitophilus zaamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae)., J. Chem. Ecol., **11**, 1-9, (1985)

研究ノート

DNAマイクロアレイ解析を活用した大豆の機能性評価

高橋　陽子*§，小西　智一**

* 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
** 秋田県立大学 生物資源科学部

Evaluation of functional properties of soybean using DNA microarray

Yoko TAKAHASHI*§ and Tomokazu KONISHI**

* National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan
** Department of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimosinjyo Nakano, Akita 010-0195, Japan

Abstract

The effect of dietary whole soybeans on rats was analyzed in the level of gene expression using DNA microarray. As soybean content increased in diet, lipid levels in serum and liver were generally lowered. To remove unwanted variation in mRNA expression signals to enable a compatible comparison across different experiments, the DNA microarray data was normalized in accordance with three-parameter log-normal distribution. DNA microarray analyses elucidated that hepatic transcriptome was globally altered depending on the amount of soybean in diets. Among various biological functions, soybean was found to specifically affect transcriptomes involved in lipid/fatty acid biosynthesis in liver. mRNA expressions of these lipogenic genes were lowered with increased amount of soybean in diet. By comparing DNA microarray data across multiple experiments, it was revealed the comprehensive functionality of soybean was correlated with that of freeze-dried tofu. Thus, DNA microarray provides powerful information for understanding the food functionality when those gene expression data is handled properly.

Keywords: soybean（大豆）, DNA microarray（DNAマイクロアレイ）, liver（肝臓）, gene expression（遺伝子発現）

§ 連絡先（corresponding author），youkot@affrc.go.jp

緒　言

大豆は他の豆類と比べ，タンパク質のほか，オリゴ糖，食物繊維，イソフラボン，ミネラル等の栄養素が豊富である[1]．大豆タンパク質は，1999年に米国FDAで心血管病のリスクを低下させるヘルスクレームが承認されたように[i]，複数のヒト介入試験で，血中LDLコレステロールを低減させる作用が報告されてきた[2]．大豆食品にはタンパク質だけではなく，不飽和脂肪酸や食物繊維，ビタミン・ミネラル類が多く含まれる一方，飽和脂肪酸が少ないことも，心血管病やがん，更年期障害，骨粗鬆症等に対して有益であると考えられている[3]．また，多種類の機能性成分が含まれる食品には，成分同士の相乗作用のように，一つの機能性成分だけでは期待できない効果が生じる可能性が少なからず存在する[4]．それにもかかわらず，大豆を含めた食品の機能性研究では，機能性成分の特定とそのメカニズム解明に関心が向けられることがほとんどであり，大豆そのものの健康作用を示すデータは少ないのが現状である．

このように，未知のファクターが多く，どのような効果が示されるかが不明な食品成分の影響を解析するには，全ゲノムトランスクリプトーム解析が適している[5]．DNAマイクロアレイ解析は，栄養素によって生じた機能性の作用メカニズムを網羅的にプロファイリングし，遺伝子発現レベルで同定することが可能である．また，個人間や食群間での食品成分に対する小さな応答の違いも検出できるため，一次的なスクリーニングにも用いられる．近年，この技術は食品の機能性解析の分野で広く利用されるようになってきたが，全ゲノムの情報は膨大であるため，データの解析法や解釈に戸惑うケースが多いようである．特に，バイオインフォマティクスや統計解析の知識が十分でないと，研究者の都合が良いようにデータを解釈しがちになり，ひいてはデータの改竄になりかねない．この問題に対処するため，様々なマイクロアレイデータの標準化法や解析法が提案されているが，決定的な方法はまだ示されていない[6]．

筆者らは，これまでに構築してきた数々の知見を基にして確立したマイクロアレイデータの標準化法を用い[7]，研究対象とするトランスクリプトームの状態を網羅的に定量できるこの測定方法の特長を生かした，食品の機能性を解析する方法を開発した．先行研究では，この方法により凍り豆腐の機能性を解析したところ，凍り豆腐の血清脂質濃度抑制作用は，豆腐中のタンパク質成分が，肝臓での脂質・コレステロール合成系を遺伝子発現レベルで抑制するために生じることが明らかとなった[8]．本研究では，大豆そのものの機能性をDNAマイクロアレイ解析により評価した．遺伝子発現レベルでの変化の全体像から，大豆の影響を受ける生物学的機能性の特定，さらに他の大豆食品の機能性と比較することで，大豆そのものが有する機能性の特徴を解明した．

実験方法

1. 飼料用大豆

酵素失活大豆粉（愛知県産フクユタカ）は西尾製粉（株）より購入した．青臭みの元になるリポキシゲナーゼと，消化阻害物質であるトリプシンインヒビターを，生大豆の状態で特殊加工により失活させたものである．大豆粉100 g中の栄養成分は以下の通りであった；エネルギー1 792 kJ，水分10.0 g，タンパク質40.0 g，脂質20.0 g，炭水化物24.5 g，食物繊維11.8 g，灰分5.5 g（製造者による分析値）．

2. 動物実験

4 週齢のSprague-Dawley雄性ラット（日本チャールス・リバー（株））を明暗サイクル（点灯7：00，消灯19：00），室温（22℃±1℃），湿度（55–65％）が一定の飼育室にて市販の標準飼料で５日間予備飼育した．その後，ラットをランダムに４群に分け，大豆粉含量の異なる食餌で21日間飼育した（n=7–8）．試験飼料中の大豆粉は，100 gあたり０ g（Soy0），12.5 g（Soy12.5），25 g（Soy25）または50 g（Soy50）とした（表１）．食餌タンパク質，脂質および食物繊維量は，各群とも20，15，および5 g/100 gとなるように，カゼイン，パーム油およびセルロースで調整した．試験期間中は自由に飲水・摂食させた．飼育終了後にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し，肝臓および脂肪組織を採取して重量を測定した．本実験は食品総合研究所動物実験委員会の承認を得て，同所規定の動物実験ガイドラインに従い実施した．

3. 血清および肝臓脂質濃度の測定

血清中の中性脂肪，総コレステロール，高比重リポタンパク質（HDL）コレステロール，リン脂質，遊離脂肪酸は，市販の測定キットを用いて測定した（和光純薬工業（株））．肝臓脂質は，Folch法により総脂質

表１．食餌組成

Ingredients (g/kg diet)	Soy0	Soy12.5	Soy25	Soy50
Casein[1]	200	150	100	0
Soy powder[2]	0	125	250	500
Cornstarch	150	150	150	150
Sucrose	449.5	402.5	355.4	261.3
Palm oil	100	75	50	0
Cellulose	50	47	44	38
Mineral mix[3]	35	35	35	35
Vitamin mix[4]	10	10	10	10
L-Cystine	3	3	3	3
Chorine bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5

Soy0, 大豆0％食; Soy12.5, 大豆12.5％食; Soy25, 大豆25％食; Soy50, 大豆50％食.
[1] カゼイン，乳由来（和光純薬（株））
[2] 酵素失活大豆粉（西尾製粉（株））
[3] AIN-93ビタミン混合（オリエンタル酵母工業（株））
[4] AIN-93Gミネラル混合（オリエンタル酵母工業（株））

を抽出した後，中性脂肪濃度は比色定量法により，コレステロール濃度はコレステロールオキシダーゼを用いた方法により測定した[9]．

4. DNAマイクロアレイによる遺伝子発現量の測定

各群から摂食量が平均的であった５個体ずつを選抜し，肝臓サンプルから得た総RNAを鋳型として，3' IVT Express Kit（Affymetrix（株））によりビオチン標識サンプルを作製した．１サンプルに１枚のAffymetrix社製Rat Genome 230_2.0アレイと反応させ，組織で発現している遺伝子の量を測定した．発現量の生データはスカイライト・バイオテック（株）のSuperNORMサービスを利用して，３パラメータ対数正規分布モデルを使ったパラメトリック法により標準化し，発現量をzスコアに変換した[8]．Affymetrix社のDNAマイクロアレイの場合，１遺伝子の発現量測定につき複数のperfect match（PM）と呼ばれる異なるプローブ配列を持つスポットを有しており，同一遺伝子であっても配列により感度に差が生じる．そこで，食餌群間の遺伝子発現量の差は，PMの感度と食餌群の違いによる二元配置分散分析で算出した[10]．大豆を含まないSoy0群と大豆を含む他の食餌群間のzスコアの差（Δz）が0.2以上で，危険率0.5％以下（$p < 0.005$）の遺伝子を，大豆摂取により発現量が有意に変化したと判断した．この条件により選抜された遺伝子は，DNAマイクロアレイ上に存在する31 042個のうち9 084個であった．

5. DNAマイクロアレイデータの処理

(1) 主成分分析

DNAマイクロアレイ解析では，各食餌群で測定した遺伝子数分の多次元なデータが得られる．その膨大なデータの扱いや解釈は容易ではない．まず，遺伝子発現レベルで全体の変化を俯瞰するために，主成分分析を実施した．主成分分析により，多次元データが持つ情報をできるだけ損なわず，少ない次元数に縮約して視覚化することで，解釈を容易にすることができる[11]．本研究では，前項で選抜基準をクリアした遺伝子全てのデータについて，各群の平均値の行列から主成分の軸を算出し，各サンプルをその軸上に展開することで，サンプルと遺伝子の主成分を求めた．

(2) 大豆摂取の影響を受けた生物学的機能の探索

大豆摂取の影響を受ける生物学的機能の特徴を捉えるため，選抜された全遺伝子について，Affymetrix社のデータベース（http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=rat230-20）で遺伝子名を特定し，各遺伝子が有すると断定または予測されている生物学的機能をGene Ontology Biological Processデータベース（http://rgd.mcw.edu/）で検索した．これらの情報から，選抜された遺伝子群の中に多く出現した機能性キーワードを二項分布により検定した[10]．このうち，出現遺伝子数が５個以上かつp値が１％以下の有意なキーワードを選抜した．

(3) 他の実験系との比較

農産物である大豆と，これを加工した大豆食品（凍り豆腐）の機能性を比較するため，本研究のDNAマイクロアレイデータと，凍り豆腐の機能性を解析した先行研究[8]のデータを調べた．両研究とも，同じパラメトリック法でデータを標準化したため，双方のデータは比較と統合が可能である[7]．両食品の機能性の相関は，大豆（食品）を含む食餌群と，含まない食餌群で得られた遺伝子発現データの差から評価した．大豆についてはSoy0群（カゼインベースの無大豆食）とSoy20（食餌中のタンパク質源の全てが大豆由来）群との差，凍り豆腐についてはC（カゼイン食）群とT20（食餌中のタンパク質源の全てが凍り豆腐由来）群[8]との差をとり，両研究間の相関を調べた．

6. 統計処理

DNAマイクロアレイ解析以外の統計処理は，ソフトウェアSPSS 13.0J for Windows（日本IBM（株））を用い，実験結果は平均値±標準偏差（SD）で表した．一元配置分散分析の後，Tukey-Kramerの多重比較検定（$p < 0.05$）で群間差を調べた．

実験結果および考察

飼育期間終了後の体重・体重増加量および飼育期間中の摂食量は，各群間で有意差はなかった（表２）．肝臓重量は，大豆を含まない食餌群と比べると，大豆を12.5％以上含む食餌群で，脂肪組織重量はSoy50群で有意に減少した．同様に，血清中の脂質濃度も大豆食で低い値を示し，Soy0群との差は，総コレステロール濃度では大豆を25％以上含む食餌群で，リン脂質はSoy50群で，遊離脂肪酸濃度はSoy12.5とSoy50群で有意であった．また，肝臓の中性脂肪濃度は大豆を12.5％以上含む食餌群で有意に低くなった．このことから，大豆タンパク質等の精製成分で示されているように[i, 2]，大豆は脂質代謝を改善する食品であることが確認された．

以上を裏付けるように，肝臓におけるトランスクリプトームは，食餌中の大豆量と相関を保ちつつ変化した．主成分分析の結果，この変化は第１主成分に現れ，最も少ない食餌大豆量でも変化は確認された（図１）．大豆が多い食餌群の個体ほど，負の方向にプロットされた．第１主成分の寄与率は77％であることから，食餌中の大豆の量は，遺伝子発現量の変化を説明する大きな要素であることがわかる．同様に投与量に依存すると考えられる若干の副次的効果が第２主成分に確認される．これらの効果は明白であり，サンプルの位置のばらつきで表される個体間差よりはるかに大きいものだった（図１）．

また，第１主成分の値が大きかった遺伝子は，いずれも大豆摂取によって発現量が抑制された遺伝子であった．これらの遺伝子からは，脂肪酸および脂質合

表２．食餌中の大豆含有量がラットの体重・臓器重量および血清・肝臓脂質濃度に及ぼす影響

	Soy0	Soy12.5	Soy25	Soy50
Final body weight (g)	325 ± 9	336 ± 19	328 ± 24	331 ± 19
Body weight gain (g/day)	8.56 ± 0.59	9.11 ± 0.98	8.72 ± 1.15	8.86 ± 0.79
Food consumption (g/day)	21.2 ± 0.7	21.3 ± 1.3	21.0 ± 1.5	20.8 ± 1.1
Liver (g/100 g BW)	4.97 ± 0.46[b]	4.39 ± 0.42[a]	4.41 ± 0.24[a]	4.18 ± 0.26[a]
Adipose tissue weight (g/100 g body weight)				
Epididymal	1.16 ± 0.18[b]	1.13 ± 0.22[b]	1.01 ± 0.19[ab]	0.837 ± 0.091[a]
Perirenal	1.73 ± 0.22[b]	1.79 ± 0.27[b]	1.73 ± 0.39[b]	1.14 ± 0.29[a]
Serum lipids (mmol/L)				
Triacylglycerol	2.14 ± 0.32	1.72 ± 0.51	1.99 ± 0.29	1.68 ± 0.50
Total cholesterol	1.94 ± 0.16[c]	1.85 ± 0.31[bc]	1.56 ± 0.24[ab]	1.39 ± 0.38[a]
HDL-Cholesterol	1.26 ± 0.41[ab]	1.37 ± 0.29[b]	1.16 ± 0.30[ab]	0.859 ± 0.334[a]
Phospholipid	2.41 ± 0.14[b]	2.09 ± 0.19[ab]	2.00 ± 0.23[ab]	1.57 ± 0.20[a]
Free fatty acid	0.974 ± 0.264[b]	0.614 ± 0.163[a]	0.722 ± 0.166[ab]	0.615 ± 0.176[a]
Liver lipids (μmol/g)				
Triacylglycerol	25.7 ± 11.5[b]	12.5 ± 6.2[a]	13.4 ± 3.3[a]	14.4 ± 7.2[a]

値は平均値±SDで示す（各群7-8匹）．表中のa-cの表示は，異なる文字を付した群間で有意差があることを示す（p <0.05）．

成に関わるキーワードが高頻度で確認された（表３）．一方，脂質代謝以外の機能性については，特徴的な生物学的機能を示すキーワードはほとんど見られなかった．主成分分析で第１主成分の値が大きかった脂質合成関連遺伝子で，各食餌群における発現量を個別に見ると，いずれも大豆の量に反して低下する傾向が認められた（図２）．したがって，大豆の摂取は脂質代謝に影響を与えること，特に脂肪酸や脂質の合成が抑制されることが明らかになった．

さらに，大豆と凍り豆腐を対象とした２つの実験間で，遺伝子発現の変化は正の相関を示した（図３）．これは，大豆と凍り豆腐が有する作用機作が共通していることを示唆している．また，相関を示す回帰直線の傾きは0.414であった．大豆と凍り豆腐の機能性が同等であれば傾きは１に近くなるため，大豆は凍り豆腐よりも全般的にやや弱い機能性を有すると考えられる．本研究では，遺伝子発現データは対数正規分布するとの数理モデルに基づいて，パラメトリック法により遺伝子発現データを標準化しているため[7]，異なる実験群で得られたデータであっても，遺伝子発現量の比較が可能である．他の研究グループでも，異なる実験間のデータ比較に適した標準化法が検討されているが[12]，DNAマイクロアレイの原理に則った方法はほとんど存在しないようである．

このように，研究目的に沿った実験計画を用意することで，ノイズを管理しながらデータの本質を明らかにすることができる．また適切な計算手法を用いれば，DNAマイクロアレイのような包括的なデータでも，実験を超えた比較ができる．こうした一般性のある解析方法は，それぞれの実験から得た知見を統合するために重要である．

謝　辞

本研究は，農林水産省委託プロジェクト研究「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」の一部として行われたものである．
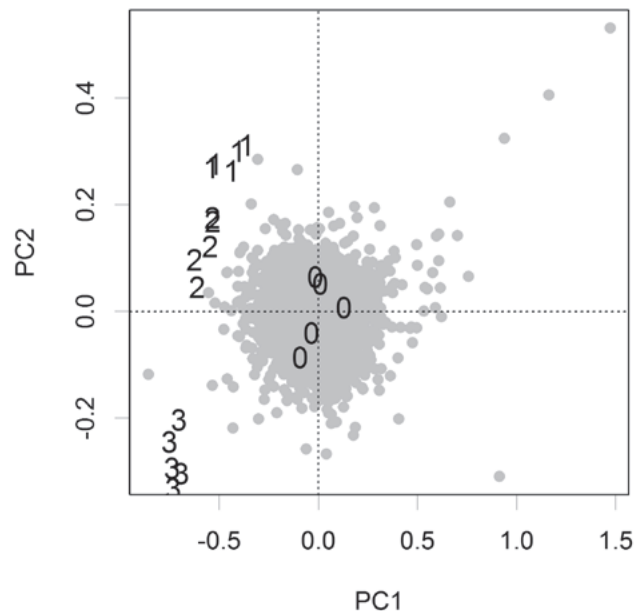
図１．食餌中の大豆含有量がラット肝臓の遺伝子発現全般に及ぼす影響（サンプルと遺伝子の主成分分析）

Soy0群と比べてSoy12.5，Soy25，またはSoy50群での発現量が有意に異なる遺伝子を選抜し，これら遺伝子全ての発現量変化の情報をbiplotで表した（各群５匹）．図中の数字は各サンプルの群名を表す：0, Soy0; 1, Soy12.5; 2, Soy25; 3, Soy50．灰色の円は１つの遺伝子を表す．X軸（第１主成分）で正の値をとる遺伝子は大豆によって発現抑制されたものである．Y軸は第２主成分である．

Probe set ID	Soy12.5	Soy25	Soy50	Gene Symbol	Gene Title
1380013_at	-0.41	-1.14	-2.15	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3
1380643_at	-0.29	-0.97	-1.71	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3
1394401_at	-0.55	-0.84	-1.14	Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids
1367707_at	-0.45	-0.66	-1.19	Fasn	fatty acid synthase
1367708_a_at	-0.37	-0.54	-1.07	Fasn	fatty acid synthase
1388108_at	-0.42	-0.60	-0.99	Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids
1368562_at	-0.34	-0.70	-0.79	Sult4a1	sulfotransferase family 4A, member 1
1370893_at	-0.42	-0.56	-0.82	Acaca	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha
1370281_at	-0.24	-0.51	-0.86	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal
1367854_at	-0.22	-0.36	-0.69	Acly	ATP citrate lyase
1369195_at	-0.21	-0.49	-0.54	Fabp2	fatty acid binding protein 2, intestinal
1367894_at	-0.22	-0.28	-0.56	Insig1	insulin induced gene 1
1370355_at	-0.12	-0.17	-0.68	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
1368453_at	-0.19	-0.33	-0.50	Fads2	fatty acid desaturase 2
1375944_at	-0.22	-0.30	-0.40	Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2

図２．大豆がラット肝臓の脂質合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響

脂質合成のキーワードを有する，第１主成分の上位15遺伝子の発現量を示す．発現量は，Δz［(Soy0)－(Soy12.5, Soy25またはSoy50)］で表した（各群５匹）．
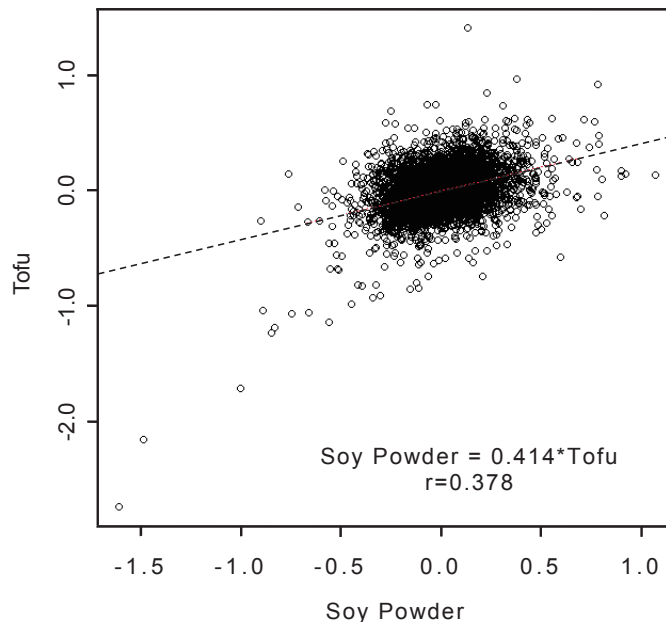
図３．大豆と凍り豆腐がラット肝臓の遺伝子発現全般に及ぼす影響の比較（相関）

X軸は，本研究での大豆摂取の影響を比較したデータ（Soy0－Soy50），Y軸は，先行研究[9]での凍り豆腐摂取の影響を比較したデータ［C（カゼイン食）－T20（凍り豆腐由来タンパク質20％食）］とし，両研究で２群の差が有意であると判定された遺伝子をプロットした．

表３．第１主成分で有意に出現確率が高かった生物学的機能キーワード

PC1-Positive

Category of Gene Ontology Biological Process	Total contents	Frequency selected	p -value
metabolic process	2384	40	5.62×10^{-9}
biosynthetic process	1364	30	1.67×10^{-9}
lipid metabolic process	309	18	1.41×10^{-12}
lipid biosynthetic process	160	17	4.77×10^{-15}
fatty acid biosynthetic process	87	12	5.20×10^{-13}
response to organic cyclic substance	321	12	9.38×10^{-7}
response to drug	588	11	1.16×10^{-3}
oxidation reduction	610	10	4.86×10^{-3}
cellular response to insulin stimulus	103	9	2.18×10^{-8}
response to insulin stimulus	180	9	2.21×10^{-6}
response to glucose stimulus	139	8	2.96×10^{-6}
response to nutrient	250	8	1.82×10^{-4}
response to cAMP	108	7	5.81×10^{-6}
fatty acid metabolic process	125	7	1.48×10^{-5}
carbohydrate metabolic process	216	7	4.27×10^{-4}
acetyl-CoA metabolic process	10	6	6.62×10^{-11}
triglyceride biosynthetic process	23	6	9.16×10^{-9}
steroid metabolic process	89	5	2.52×10^{-4}
response to retinoic acid	109	5	6.25×10^{-4}

PC1-Negative

Category of Gene Ontology Biological Process	Total contents	Frequency selected	p -value
metabolic process	2384	34	3.79×10^{-6}
oxidation reduction	610	18	5.88×10^{-8}
transmembrane transport	687	12	1.25×10^{-3}
response to nutrient	250	8	1.82×10^{-4}
response to glucocorticoid stimulus	195	6	1.43×10^{-3}
anion transport	41	5	6.58×10^{-6}

各群５匹のDNAマイクロアレイデータから，遺伝子数が５個以上のカテゴリー（キーワード）を選抜した．

要　約

DNAマイクロアレイを用い，遺伝子発現レベルでラットにおける大豆の機能性を解析した．食餌中の大豆の量が増えるとともに，血清および肝臓の脂質濃度は全般的に低下した．DNAマイクロアレイで得られた，遺伝子発現シグナルに含まれる不要なノイズを除き，異なる実験間で遺伝子発現変化の比較ができるように，３パラメータ対数正規分布に従ってデータを標準化した．DNAマイクロアレイ解析によって，肝臓のトランスクリプトームは，食餌中の大豆の量に応じて全体的に変化することが観察された．数々の生物学的機能のうち，大豆は肝臓での脂質・脂肪酸合成に関わるトランスクリプトームに特異的に影響した．これらの脂質合成系遺伝子のmRNA発現量は，食餌大豆量の増加に伴い低下した．複数の実験間でDNAマイクロアレイデータを比較することにより，大豆の総合的な機能性は，凍り豆腐の機能性と相関があることが明らかになった．このように，DNAマイクロアレイ解析は，遺伝子発現データが適切に取り扱われるとき，食品の機能性を理解するための説得力のある情報をもたらすことができる．

引用文献

１）Mateos-Aparicio, I., Redondo Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J. and Zapata-Revilla, M.A., Soybean, a promising health source. *Nutr. Hosp*,. **23**, 305-312 (2008).

２）Anderson, J.W. and Bush, H.M., Soy protein effects

on serum lipoproteins: a quality assessment and meta-analysis of randomized, controlled studies. *J, Am, Coll, Nutr*., **30**, 79-91 (2011).

3) Sacks, F.M., Lichtenstein, A., Van Horn, L., Harris, W., Kris-Etherton, P. and Winston, M., Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, **113**, 1034-1044 (2006).

4) Jacobs, Jr., D.R., Gross, M.D. and Tapsell, L.C., Food synergy: an operational concept for understanding nutrition. *Am. J. Clin. Nutr*., **89S**, 1543S-1548S (2009).

5) Keijer, J., van Helden, Y.G., Bunschoten, A. and van Schothorst, E.M., Transcriptome analysis in benefit-risk assessment of micronutrients and bioactive food components. *Mol. Nutr. Food Res*., **54**, 240-248 (2010).

6) Ramasamy, A., Mondry, A., Holmes, C.C. and Altman, D.G., Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS Med*., **5**, e184 (2008).

7) Konishi, T., Three-parameter lognormal distribution ubiquitously found in cDNA microarray data and its application to parametric data treatment. *BMC Bioinformatics*., **5**, 5 (2004).

8) Takahashi, Y. and Konishi, T., Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *J. Agric. Food Chem*., **59**, 8976-8984 (2011).

9) Takahashi, Y. and Ide, T., Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipose tissues of rats. *J. Nutr. Biochem*., **19**, 682-693 (2008).

10) Konishi, T., Konishi, F., Takasaki, S., Inoue, K., Nakayama, K. and Konagaya, A., Coincidence between transcriptome analyses on different microarray platforms using a parametric framework. *PLoS One*, **3**, e3555 (2008).

11) Jackson, J.E., PCA with more than two variables. In "A user's guide to principal components," 1st ed. (Wiley), pp26-62 (1991).

12) Autio, R., Kilpinen, S., Saarela, M., Kallioniemi, O., Hautaniemi, S. and Astola, J., Comparison of Affymetrix data normalization methods using 6,926 experiments across five array generations. *BMC Bioinformatics*., **10**, S24 (2009).

引用 URL

i) http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr;sid=502078d8634923edc695b394a357d189;rgn=div8;view=text;node=21%3A2.0.1.1.2.5.1.13;idno=21;cc=ecfr (2012.11.21)

研究ノート

*Aspergillus oryzae*菌体内グルタチオンに対する環境ストレスの影響

服部　領太，鈴木　聡，楠本　憲一[§]

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

The effect of environmental stresses on intracellular glutathione levels of *Aspergillus oryzae*

Ryota Hattori, Satoshi Suzuki, Ken-Ichi Kusumoto[§]

Applied Microbiology Division, National Food Research Institute, NARO

Abstract

Glutathione (γ-glutamyl-cysteinylglycine) is a major thiol compound that plays various roles *in vivo*. This study focused on intracellular glutathione levels and on the influence of the environmental stresses on the levels under filter culture condition in *Aspergillus oryzae*. The profile of the levels showed a peak on the second day after inoculation. Under oxidative stress, the levels did not change. The levels increased under heavy metal stress and decreased under nitrogen source deficient condition.

緒　言

*Aspergillus oryzae*は日本醸造学会により我が国の国菌と認定された有用糸状菌であり，古来より味噌，醤油などの伝統的発酵食品の製造に麹菌として利用されている．それは，*A. oryzae*が持つ，糖質やタンパク質等を加水分解する酵素群の生産能が高いことに由来する．醸造業界では作業効率向上のため，現状の麹菌株よりもさらに短時間で培養が終了する増殖力の高い菌株や，分生子形成が現状よりも盛んな菌株が望まれており，これらの要望に応えるための方策の一つとして環境ストレスに対する耐性の高い菌株，生育の速い菌株の育種が喫緊に必要とされている．

グルタチオン（γ−L−グルタミル−L−システイニルグリシン）はチオール基を有するトリペプチドで，あらゆる生物の細胞に普遍的に存在する物質である．その生体内での生理的役割は酸化ストレス，重金属ストレス等の様々なストレス耐性に関与しており，菌体の成長に影響を及ぼす[1]．グルタチオンの代謝経路としてはγ−グルタミルサイクルが提唱されており，γ−グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素を介して合成される[1]．

また，グルタチオンは医療やサプリメントなどに利

§ 連絡先（Corresponding author），kusumoto@affrc.go.jp

用されるため，菌培養によるグルタチオン合成経路を利用する効率的な大量生産を目的とした研究が行われている[2]．さらに，酵母などでグルタチオン高生産株の育種が行われ，特許が取得されている．しかし，糸状菌に関して報告は，主に*Penicillium chrysogenum*における細胞内グルタチオンについて報告があるものの[3−5]，グルタチオンの生産に関する知見は未だ不充分である．醸造用微生物である*A. oryzae*におけるグルタチオン生産の知見が得られると我が国独自の麹菌によるグルタチオン生産や麹菌を用いた醸造食品の新たな価値の付与が期待される．そこで，本研究では*A. oryzae*を用いて培養を行い，菌体内グルタチオン含有量の経時的変化，およびストレス環境下における蓄積量の変化を調べた．

実験材料および方法

供試菌株として*Aspergillus oryzae* RIB40株を使用した．ツァペック・ドックス寒天培地（1%(w/v) D-glucose，0.6%(w/v) $NaNO_3$，0.15%(w/v) KH_2PO_4，0.03%(w/v) KCl，0.2%(v/v) 1 M $MgSO_4$ solution，0.01%(v/v) trace element solution(0.88%(w/v) $ZnSO_4$・$5H_2O$，0.1%(w/v) $FeSO_4$・$7H_2O$，0.04%(w/v) $CuSO_4$・$5H_2O$，0.001%(w/v) $Na_2B_4O_7$・$10H_2O$)，2%(w/v) agar），にメンブレンフィルター（A020A090C：ADVANTEC）を乗せたプレート培地を作製し，接種する分生子数が2×10^5となるように調製して30℃でフィルター培養を行った．培養区の設定は非ストレス区（対照区），ストレス条件としてカドミウム（Cd）添加培地（10 mM $CdCl_2$），窒素（N）源欠乏培地（上記より0.6% $NaNO_3$を除く），10 mM過酸化水素（H_2O_2）含有培地を設定した．過酸化水素含有培地はツァペック・ドックス培地をオートクレーブ滅菌後に，フィルター滅菌を行ったH_2O_2を上記の濃度になるように添加した．各区２日目まで対照区と同様にツァペック・ドックス培地で生育させた後，フィルターごと菌体を各ストレス条件培地に移し換えて培養を継続した．培養後，菌体コロニーを経時的に回収し，液体窒素で凍結破砕，５％(w/v) 5−スルホサリチル酸を10μl/mg cell weight になるよう添加・撹拌後，15,000g，４℃で10分間遠心し，得られた上清をサンプル溶液とした．グルタチオンの定量は，HT Glutathione Assay Kit（TREVIGEN）を用いて測定を行ない，標準試料より得られた検量線を使用して算出した．

実験結果および考察

１．*A. oryzae*菌体内グルタチオン量の経時的変化

本研究では*A. oryzae*の培養法としてフィルター培養を採用した．最少培地であるツァペック・ドックス培地を用いてフィルター培養を行った*A. oryzae*菌体内のグルタチオン含有量は，２−３日目でピークを迎え，その後減少した（図１）．

*Aspergillus nidulans*では発芽時にカタラーゼをコー
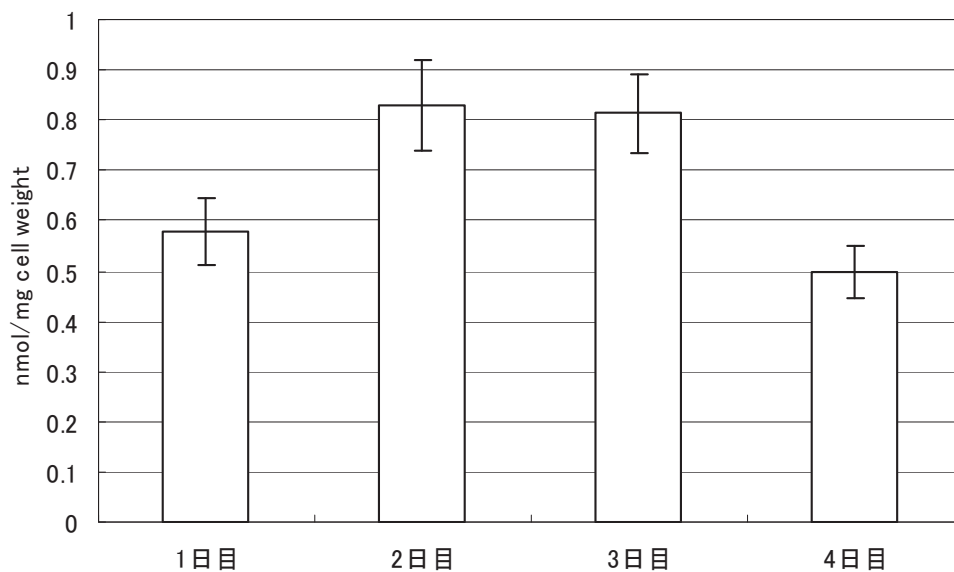
図１．***A. oryzae*** RIB40菌体内グルタチオン含有量の経時的変化

ドしている遺伝子*catA*の翻訳が増大することからも，呼吸によって発生する活性酸素種等による酸化ストレスに対する耐性機構は重要であると考えられている[6]．坂本らの報告によれば*A. oryzae*において，転写制御因子遺伝子である*aftA*破壊株では胞子発芽率の減少がみられた．破壊株において分生子中アミノ酸含量を測定したところ，主要な貯蔵アミノ酸であるグルタミン酸の含量が大きく低下していた[7]．また，*catA*と共にグルタチオン合成酵素である*GSH1*のホモログの発現も減少していた．これによりグルタチオン合成も酸化ストレス耐性機構に関与していることが推察された[8]．また，佐野らによればフィルター培養は通常の寒天培地よりも水分活性が低く，*A. oryzae*は乾燥ストレスの影響を受けるとしている[9]．本試験では培養開始から２日目にかけてグルタチオン含有量の増加が確認された．各種ストレスに対応するため発芽・増殖の段階で速やかにグルタチオンを合成，蓄積したと考えられる．

本培養では２−３日目に分生子形成が確認され，以降４日目まで分生子の増加が視認された．*A. oryzae*は固体培養を行う際，分生子から発芽して菌糸を伸ばしていく．菌糸は栄養を取り込むための基底菌糸と空中に伸びる気中菌糸があり，分生子は気中菌糸の先端部に形成される．時間の経過と共にコロニー中の分生子が形成されることによって，総菌体中の分生子の割合は増加したと考えられる．分生子の形成が見られ始める２−３日目以降にコロニー菌体全重量あたりのグルタチオン含量が低下していった．グルタチオンはアミノ酸貯蔵の役割を担っており，栄養状態によって分解を受け資化される[1]．菌体内グルタチオンは分生子形成に使用されて減少したと考えられる．

２．ストレス環境下における菌体内グルタチオン量の変化

２日目までツァペック・ドックス寒天培地で培養を行った菌体を，ストレス区として設定したH_2O_2添加培地，Cd添加培地，N源欠乏培地にフィルターごと移し換え，培養を継続した．各区において菌体の生育に大きな差は見られなかった．移動１日後（３日目），２日後（４日目）のグルタチオン量を測定した（図２）．H_2O_2添加区では日数を経ても２日目の対照区とグルタチオン量に変動による差が見られなかっ
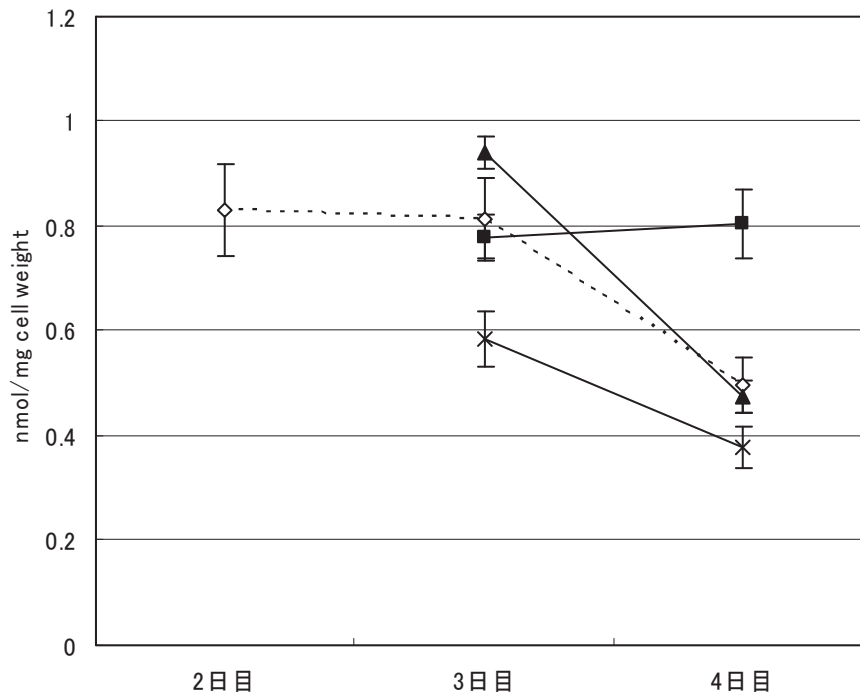
図２．ストレス環境下における*A. oryzae* RIB40菌体内グルタチオン含有量の変動

（◇：対照区，■：H_2O_2添加区，▲：Cd添加区，×：N源欠乏区）
２日目に対照区からフィルターごとストレス区の培地へ移行させた．３日目，４日目はそれぞれ，移行後１日目および２日目に相当する．

た．Cd添加区では３日目で対照区の115.6±3.7%と，やや上昇した後４日目で対照区と同等になった．N源欠乏区では３日目，４日目共に同日の対照区と比較して71.6±6.5%，75.6±8.0%と低い値となった．

グルタチオンはグルタチオンペルオキシダーゼやグルタチオン−S−転移酵素を介して活性酸素種や薬物と反応し酸化型となる．酸化型グルタチオンはグルタチオン還元酵素によって還元型へと戻ることでリサイクルされる．H_2O_2によって引き起こされる酸化ストレスがグルタチオン総量に変化をもたらすことは報告がほとんど無い．ただし，*Saccharomyces cerevisiae*では，好気培養下において*GSH1*の転写には影響が無くシスタチオニンβ合成酵素活性上昇による細胞内システイン量の上昇に伴いグルタチオンが増加した[10]．または，培地内にグルタミン酸，グルタミン，リシン添加時に*GSH1*発現が上昇した[11]，といったような，限定的な報告例がある．グルタチオンが関与する酸化ストレス耐性機構はグルタチオン還元酵素を介した酸化還元サイクルが主要であると考えられる．*A. nidulans*でもグルタチオン機構が酸化ストレス耐性を担っていることが明らかにされた[12]．本試験で３日目の対照区とH_2O_2添加区でグルタチオン含有量に差が無かったことは，*A. oryzae*においても，グルタチオンによる酸化ストレス耐性はグルタチオン還元酵素によるところが大きいと推察される．ただし４日目のH_2O_2添加区におけるグルタチオン含有量が対照区と比較して高いまま推移していた理由は定かでなく，今後明らかにする必要がある．

*S. cerevisiae*ではCdイオンによってグルタチオン合成系が誘導されることが知られている[13]．重金属を抱合したグルタチオンはATP結合カセットトランスポーターであるYcf1を介して液胞に輸送される[14]．また，液胞ではグルタチオンやグルタチオン複合体はγ-グルタミン酸転移酵素，アミノペプチダーゼであるLap4といったグルタチオン分解経路の酵素によりアミノ酸へ分解され再利用されると考えられている[15, 16]．*A. nidulans*では，N源代謝調節因子であるURE2と相同性を持つものがグルタチオン−S−転移酵素として機能しており，重金属の排出に関する機構は*S. cerevisiae*と同様であると考えられている[17]．本研究の結果から，*A. oryzae*でも上記の排出機構が備わっており，Cdによるグルタチオン合成の誘導がストレス負荷直後のグルタチオン含有量の増加につながったと考えられる．一方，４日目で対照区と同レベルになった理由は明らかではない．今後グルタチオン分解経路の酵素遺伝子の発現変化を調べることでその理由を解明したい．

S. cerevisiae ではN源飢餓状態で，グルタチオン分解に代謝がシフトする．*S. cerevisiae*菌体をN源欠乏培地に移して培養を継続した場合，分解酵素であるγ−グルタミン酸転移酵素の活性が上昇し，４時間後には細胞内グルタチオン量が減少した[18]．一方，*P. chrysogenum*ではN源の違いやN源欠乏は細胞内グルタチオン量に影響を及ぼさなかったという報告がある[4, 5]．しかし，*A. nidulans*では炭素源欠乏培地による培養でγ−グルタミン酸転移酵素の活性が上昇とグルタチオン量の減少が確認されている[19]．そのため，Pocsiらは，*P. chrysogenum*においてもグルタチオンをN源として利用している可能性に言及している[3]．本試験ではN源欠乏区で対照区と比較して３−４日目を通じて細胞内グルタチオン量の減少が確認された．従って，*A. oryzae*でも*S. cerevisiae*と同様にグルタチオンをN源として利用していることが考えられる．以上の結果より，*A. oryzae*における細胞内グルタチオン量は環境ストレスの影響を受けることが示唆された．

醸造の際に麹菌は，蒸煮された米や大豆等の表面で40時間前後生育し，空気に直接晒されて酸化ストレスを受けている．他にも，種麹として用いられる分生子の発芽率に関しても酸化ストレス耐性が大きく影響することが示唆されている[8]．ストレス耐性や分生子の発芽率が高く，さらに増殖率の高い菌株であれば培養が短時間で済み，効率的な物質生産が可能となることからコストの低減につながる．そのために産業界では，このような菌株の育種・利用が喫緊に求められている．また，グルタチオン自身にも，味覚におけるフレーバー（こく味）を増強する機能があるとの報告もある[20]．しかし，現段階において日本では食品添加物として認可されていない．食品に利用可能な麹菌のグルタチオン高生産株の取得は，醸造食品の高付加価値化につながることが期待される．今後，グルタチオン強化麹菌株の育種にむけた基盤的知見を積み重ねることにより，醸造産業へのフィードバックを行いたい．

要　約

グルタチオンは生体内に存在するトリペプチドであり，様々なストレス耐性に関与していることが知られている．本研究では醸造用麹菌である*Aspergillus oryzae* RIB40のフィルター培養条件下における細胞内グルタチオン含有量の経時的変化を測定した．分生

子接種後２−３日で細胞内グルタチオン量が最大となり，４日目には低下した．また，最少培地での培養を２日間行った後，環境ストレスとして設定した，酸化ストレス区（H_2O_2添加培地），重金属ストレス区（Cd添加培地），飢餓ストレス区（N源欠乏培地）での培養を継続して行った．グルタチオン含有量の変動を調べたところ，対照区と比較して酸化ストレス区では変化は見られなかったが，重金属ストレス区では一時的な上昇が見られた．また，飢餓ストレス区ではグルタチオン含有量は総じて減少していた．このことから，*A. oryzae*において細胞内グルタチオン量は環境ストレスの影響を受けることが示唆された．

引用文献

１）Pocsi, I., Prade, R.A. and Penninckx, M.J., Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi, *Adv. Microb. Physiol.*, **49**, 1-76 (2004).

２）Wang, M., Sun, J., Xue, F., Shang, F., Wang, Z. and Tan, T., The Effect of intracellular Amino Acids on Production by High-cell-density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae, Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**, 198-205 (2012).

３）Pocsi, I., Molnar, Z.S., Pusztahelyi, T., Varecza, Z. and Emri, T., YEAST-LIKE CELL FORMATION AND GLUTATHIONE METABOLISM IN AUTOLYSING CULTURES OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM, Acta Biol. Hung.*, **58**, 431-440 (2007).

４）Emri, T., Pocsi, I. and Szentirmai, A., Phenoxyacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillin chrysogenum, J. Basic Microbiol.*, **37**, 181-186 (1997).

５）Emri, T., Sami, L., Szentirmai A. and Pocsi, I., Co-ordination of the nitrate and nitrite assimilation, the glutathione and free radical metabolisms, and the pentose phosphate pathway in *Penicillium chrysogenum, J. Basic Microbiol.*, **39**, 109-115 (1999).

６）Oh, Y.T., Ahn, C.S., Kim, J.G., Ro, H.S., Lee, C.W. and Kim, J.W., Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans, Fungal Genet. Biol.*, **47**, 246-253 (2010).

７）坂本和俊，麹菌胞子の耐久性にかかわる遺伝子の発現制御機構について，醸協，**105**, 762-769（2010）.

８）Sakamoto, K., Iwasita, K., Yamada, O., Kobayashi, K., Mizuno, A., Akita, O., Mikami, S., Shimoi, H. and Gomi, K., *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance, *Fungal genet. Biol.*, **46**, 887-897 (2009).

９）佐野元昭，小林亜希子，町田雅之，大箸信一　麹菌フィルター培養条件下での解析，第５回糸状菌コンファレンス要旨集, **p. 40**, 東京（2005）.

10）Ohmori, S., Nawata, Y., Kiyono, K., Murata, H., Tsuboi, S., Ikeda, M., Akagi, R., Morohashi, K-I.and Ono, B-I., *Saccharomyces cerevisiae* cultured under aerobic and anaerobic conditions: air-level oxygen stress and protection against stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 587-594 (1999).

11）Stephen, D.W.S. and Jamison, D.J., Aminoacid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae GSH1* gene by hydrogen peroxide, *Mol. Microbiol.*, **23**, 203-210 (1997).

12）Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T. and Takaya, N., The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8042-8053 (2009).

13）Dormer, U.H., Westwater, J., McLaren, N.F., Kent, N.A., Mellor, J. and Jamieson, D.J., Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32611-32616 (2000).

14）Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele D.J. and Rea P.A., A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 42–47 (1997).

15）Adamis, P.D., Panek, A.D. and Eleutherio, E.C., Vacuolar compartmentation of the cadmium –glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicol. Lett.*, **173**, 1–7 (2007).

16）Adamis, P.D., Mannarino, S.C., Riger, C.J., Duarte, G., Cruz, A., Pereira M.D. and Eleutherio, E.C., Lap4, a vacuolar aminopeptidase I, is involved in cadmium –glutathione metabolism. *Biometals*. **22**, 243-249 (2009).

17）Fraser, J.A., Davis, M.A. and Hynes, M.J., A Gene from *Aspergillus nidulans* with Similarity to *URE2* of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Glutathione S-Transferase Which Contributes to Heavy Metal and

Xenobiotic Resistance, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2802–2808 (2002).

18) Mehdi, K. and Penninckx, M.J. An important role for glutathione and y-glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae, Microbiology.* **143**, 1885-1889 (1997).

19) Emri, T., Molnar, Z., Pusztahelyi, T. and Pocsi, I., Physiological and Morphological Changes in Autolyzing *Aspergillus nidulans* Cultures. *Folia Microbiol.*, **49**, 277-284 (2004).

20) Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M. and Miyajima, R., Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs, *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, **61**. 1977-1980 (1997).

研究ノート

MPN-RealTime PCRによる市販鶏肉中の*Campylobacter jejuni*の定量と分布

川崎　晋§，細谷　幸恵，根井　大介，稲津　康弘，川本　伸一

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

Quantitative analysis of *Campylobacter jejuni* by MPN-RealTime PCR in retail chicken meats

Susumu Kawasaki§, Yukie Hosotani, Daisuke Nei,
Yasuhiro Inatsu and Shinichi Kawamoto

National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Quantitative analysis of *Campylobacter jejuni* by MPN-RealTime PCR was performed in retail chicken meats. At the same time, the important microbiological viable counts (such as, total viable cell, coliform, anaerobic cell counts, etc.) were estimated for searching surrogate indicators of *C. jejuni* counts. The quantitative range of MPN- RealTime PCR was estimated 0.04～31000 CFU/g, 32/52 of samples (62%) were positive for *C. jejuni* contamination. However, clear correlation was not observed between the level of contamination of *C. jejuni* and the viable counts of sanitation indicator bacteria tested by multiple regression analysis.

Key words: *Campylobacter jejuni*; MPN-RealTime PCR

緒　言

近年，我が国では*Campylobacter jejuni/coli*を原因菌とした食中毒が急増しており，その発生件数は食中毒細菌による原因物質の１位となっている．*Campylobacter*による食中毒の主要原因食品としては鶏肉によるものが数多く報告されている．カンピロバクターは動物の腸管内に生息し，一般に家畜・家禽の保菌率が高いために，と畜場や食鳥処理場での生体解体工程や，食肉店舗での処理過程での交差汚染により，市販生肉が汚染を受けている可能性がある．特に鶏肉では*C. jejuni*が30～50％，*C. coli*が数％陽性という，極めて高い汚染率が報告されている[1)]．

このような汚染実態からカンピロバクター食中毒は散発事例が数多く報告されている．しかし，本菌によ

§ 連絡先（corresponding author），skawasa@affrc.go.jp

る食中毒は潜伏期が比較的長く低菌数で感染が成立することから，疫学的調査が困難かつ不十分となっている現状がある．さらに，カンピロバクターの検査には微好気条件（酸素濃度５％）や血液培地など，特殊な培養環境条件の設定が必要[2]なため，その調査をさらに困難にしている．本菌の培養法による検出は熟練の技術を要し，これに加えて，食品中における本菌の定量値を得るとなれば，その労力は膨大なものとなる．

しかし，近年のPCR法の発展により，特定微生物の検出の簡易高感度化が進んできた，一般にPCR法の感度は10^3CFU（CFU: Colony Forming Unit）の菌体が存在すれば核酸抽出過程を考慮しても検出可能であり[3]，その高感度な手法から分布調査の効率化への活用が期待されてきた．また，蛍光プローブとPCR法を組み合わせたRealTime PCR法による解析法は,PCR反応過程を蛍光で直接モニタリング可能なことから，高感度迅速な菌の陽性/陰性判定に加えて定量も可能であると期待されている．

本研究では，RealTime PCR法による迅速な菌の陽性/陰性判定とMPN（最確数法：Most Probable Number）による定量計算法を組み合わせて，市販鶏肉中の*C. jejuni*の定量を試みた．MPN法は試料中の標的微生物数が微量でも，その単位体積当たりに存在する微生物数はポアソン分布に従うと推定して菌数を求める手法であり，確率分布的定量試験法として普及している．本法では希釈系列が多く必要なものの，最確数表により簡易に菌数を求めることができる．この手法とPCR法での迅速な判定を組み合わせれば,多数検体数の処理が可能であり，本菌の汚染状況把握に有効活用できる可能性がある．また，同時に一般生菌数や大腸菌群などの汚染指標，ならびに嫌気性菌数などの測定により，これらと*C. jejuni*汚染との関連性についても検討した．

実験材料および方法

１．供試検体

検体は2011年から2012年の間で，茨城県つくば市内の市販鶏肉および直接食鳥処理場から入手した鶏肉，計52検体を用いた．

２．サンプル処理および汚染指標菌数の測定

供試検体は，図１に示したスキームにより処理した．供試検体25 gを測りとり，これに抗生物質を除いた５％馬血液添加Bolton培地（OXOID）を225 mL加え，ストマッカー処理した．この乳剤２mLを滅菌カップに移し，菌数測定を行った.菌数測定はスパイラルプレーティング法で行い，菌液をTSA（Difco）平板［一般生菌数］１枚，Coliform寒天（Merck）平板［大腸菌群数および大腸菌数］１枚，TSC寒天基礎培地平板（自家調整：１Lあたりトリプトン15 g，大豆ペプトン５g，ラブレムコ末５g，酵母エキス５g，メタ亜硫酸ナトリウム１g，クエン酸アンモニウム第二鉄１g，寒天14 g）［硫化水素産生嫌気性菌数］１枚，BHI寒天（日水製薬）平板［一般嫌気性菌数，一般微好気性菌数］２枚，CCDA（OXOID）平板［*Campylobacter*分離用選択培地に現れる菌数］１枚にそれぞれ塗抹した．塗抹した平板はBHI寒天平板とCCDA平板それぞれ１枚は微好気条件で，残り１枚のBHI寒天平板とTSC寒天平板１枚は嫌気条件で培養した．培養気相条件は，アネロパック微好気ならびに嫌気培養用パック（三菱ガス化学）と専用の嫌気ジャー（三菱ガス化学）を用いて調整した．これらと残りの塗抹平板は35℃好気条件で培養し，その菌数を計測した．Coliform寒天平板では大腸菌群および大腸菌の典型集落数を数えた．

３．MPN-RealTime PCRによる*C. jejuni*の定量

２．で処理した乳剤250 mLに所定の濃度となるよう抗生物質サプリメント（Bolton Broth Selective Supplement（OXOID））を加え,ストマッカー袋内で良く撹拌した．撹拌した後，乳剤１mLを抗生物質サプリメント含む５％馬血液添加Bolton培地９mLが分注された試験管１本に加えた．同時に乳剤350 μL，35 μLを滅菌済みのマイクロタイタープレートに３ウェルずつ分注した．さらに乳剤１mLは９mLの滅菌希釈水で２回段階希釈し，各35 μLを３ウェルずつ分注した．35 μL分注したウェルにはさらに抗生物質含む５％馬血液添加Bolton培地315 μLを加え,合計の容量を350 μLとした.最終的に，ストマッカー袋，試験管，分注したマイクロタイタープレートを42℃ 48時間微好気培養した．

培養後，各350 μLの菌液を核酸抽出に供した．核酸抽出はDNA extraction kit［TA10］（プリマハム）を用いた.核酸抽出プロトコールは取扱説明書に準じた.抽出した核酸２μLをRealTime PCRによる検出に供した．RealTime PCR条件及びPCRプライマーと蛍光プローブはNogva et al.[4]に従った．RealTime PCRにより所定の蛍光が観察された検体を陽性と判定し，その陽性数から*C. jejuni*の菌数をMPN法による計算で求めた．

4．統計処理

得られた*C. jejuni*菌数ならびに，２．での各平板で求めた菌数との関連性を求めるため重回帰分析を行い，重相関係数・決定係数・偏回帰係数を求めた[5]．計算はMicrosoft EXCEL 2007を用いて行った．

結果および考察

PCR法を用いた*C. jejuni*定量を行う前に，検出感度および検体からの核酸抽出の際の食品由来の阻害物質の影響を予備検討した．抗生物質を含む５％馬血液添加Bolton培地225 mLに鶏肉25 g加えて乳剤とした検体にあらかじめ既知濃度の*C. jejuni*を加えたものから，核酸を抽出し本検出に供した結果，その検出感度は1.2×10^3細胞であった（Data not shown）．この値はPCRの検出感度として十分であり，鶏肉および培地混在系でも検出可能であることを示した．今回の核酸抽出には，以前著者らが食品において評価した核酸抽出法[6]を用いたが，本抽出法は馬血液などを含む特殊な培地については検討を行っていなかった．今回の実験系では５％馬血含有培地を使用しても検出感度が劣らないことから，この抽出法は本実験系においても活用できることが明らかとなった．

今回のMPN法では図１に示したように３本法を変法して行った．本希釈系列でのMPN定量幅は確率論的ではあるが0.04～31000 CFU/gの範囲，すなわち食品衛生法で規定される25 g当たり１細胞以上で定量値が得られるよう設定した．一般に*Campylobacter*の汚染はごく少量であり，低菌数（Black *et al.*[7]によれば100 CFU）でも感染が成立することから，より希釈系列を増やすことも検討したが，労力・操作性およびランニングコストの点から上記の希釈系で行うこととした．

MPN-RealTime PCRにて*C. jejuni*を検出したところ，52検体中32検体（およそ62％）が陽性と得られた（図２-a）．この結果は，過去の文献値[1]とおおよそ一致した．得られた*C. jejuni*菌数にはばらつきがあるものの，ほとんどが0.04～10 cells/gの範囲であった．10 cells/gを超えたのは５検体であり，15～660 cells/g
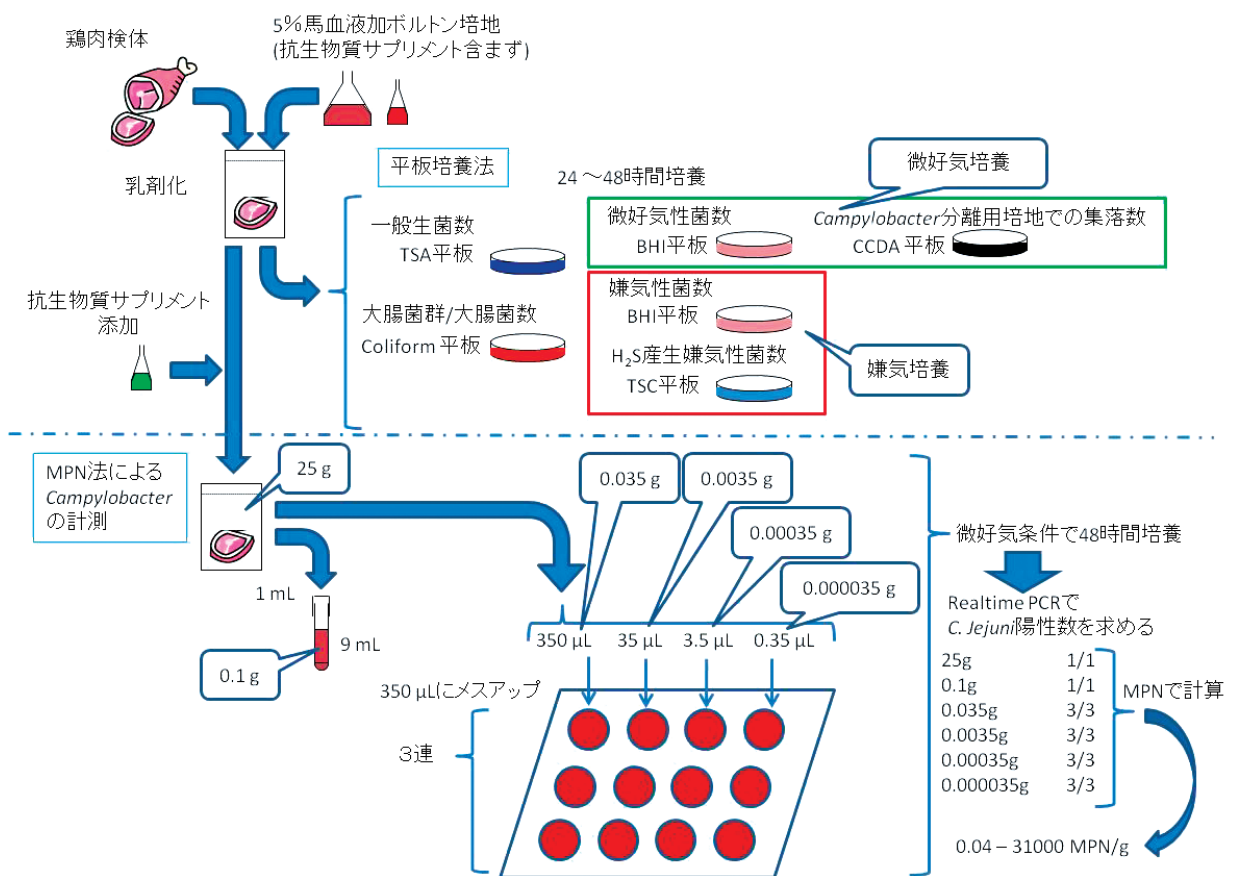
図１．本実験のMPN-Realtime PCR法と菌数検査のスキーム

で推移した．これらの検体は全て鶏モモ肉であったが，特定の産地のみが汚染頻度が高いという結果は得られなかった．

その他，汚染指標菌数として考えられる一般生菌数（TSA平板による菌数）・大腸菌群数（Coliform寒天による菌数）および嫌気性菌数（嫌気条件で培養したBHI寒天による菌数）の分布を図２-b，c，dに示した．一般生菌数と嫌気性菌数は，それぞれ10^4 CFU/gと10^3 CFU/gを中心に推移しているのに対し，大腸菌群数は10^4 CFU/g以下に収まるなかで，均等に分布していた．

重回帰分析により上記の汚染指標と*C. jejuni*菌数との関連性を求めたが，いずれも明確な相関関係は認められず，大腸菌の有無と*C. jejuni*菌数との関連性も認められなかった．古田ら[8]は，糞便由来大腸菌（*E. coli*）の汚染レベル（10 CFU/g以上）と*Campylobacter*および*Salmonella*の汚染率との関連性を皮つき肉や砂肝などの内臓肉において認めているが，本結果では糞便由来大腸菌に10^2 CFU/gの頻度で汚染されていても*Campylobacter*が検出されない結果が得られており，明確な関連性までを認めることができなかった．

本研究では，一般に検討されている汚染指標菌だけでなく嫌気性菌数や微好機性菌数，硫化水素産生嫌気性菌数についても*C. jejuni*菌数との関連性を検討したが，明確な関連性は得られなかった．*C. jejuni*の汚染は鶏肉の解体時における腸管内容物汚染が大きな原因と考えられているが，通常汚染指標とされる一般生菌数や大腸菌群などとの相関は得られなかった．また多数培地を用いて嫌気性菌など様々な微生物群の菌数を求め，*C. jejuni*の汚染度を把握できる指標菌の探索を行ったが，難しいと考えられた．

しかしながら，本MPN-RealTime PCR法では*C. jejuni*の定量を従来法よりも労力を圧倒的に削減して実施できることから，本菌の鶏肉汚染状況の迅速な把握に活用できる可能性を示した．
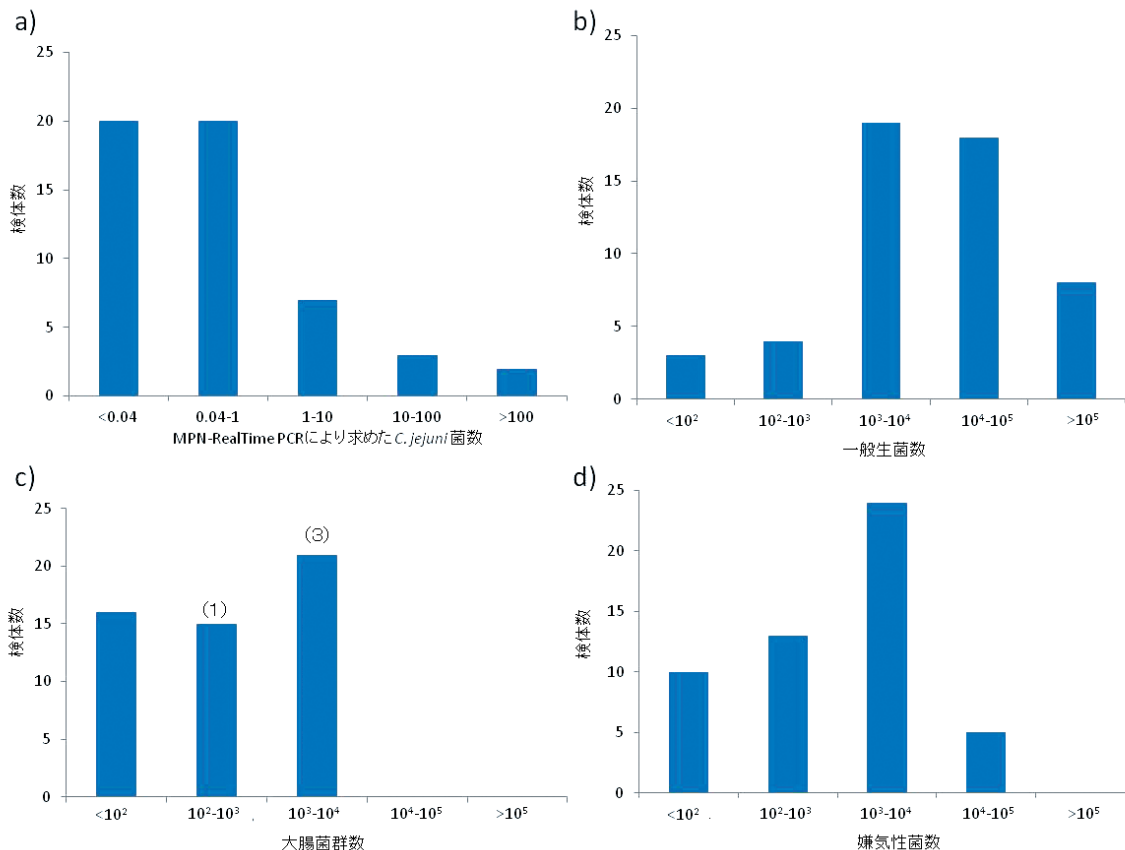
図２．市販鶏肉中における各生菌数の分布．大腸菌群の分布（c）のグラフ内に示した括弧内の数字は大腸菌検出数を示す．

要　約

RealTime PCRとMPN法を組み合わせた方法により，市販鶏肉中の*Campylobacter jejuni*の定量を試みた．また同時に一般生菌数・大腸菌群数・嫌気性菌数などの汚染指標菌数も同時に測定し，これらの結果と*C. jejuni*の汚染度との関連性を求めた．*C. jejuni*の定量範囲は0.04～31000 CFU/gであり，52検体中32検体（およそ62％）が*C. jejuni*陽性と得られた．この定量結果と汚染指標菌数や様々な平板で出現した集落数などとの関連性の有無を重回帰分析により求めたが，関連性の認められる因子を見出だすことはできなかった．

参考文献

1）「食中毒予防必携」，厚生省生活衛生局食品保健課乳肉衛生課食品化学課監修，((社) 日本食品衛生協会，東京)，(1998)．

2）「食品衛生検査指針−微生物編−」，厚生労働省監修，((社) 日本食品衛生協会，東京)，(2004)．

3）Kawasaki, S., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in meat samples. J. Food Prot. **68**, 551-556 (2005).

4）Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A., Rudi, K., Application of the 5’− nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, Appl Environ Microbiol., **66**, 4029-4036 (2000).

5）高橋正弘，吉田芳哉，志賀康造，横山公通，鈴木和雄，小林正稔，金子精一，加熱・非加熱食品の重要な微生物管理点の推定，防菌防黴，**27**, 153-158（1999）.

6）Kawasaki, S., Fratamico, P. M., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., Evaluation of the Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Esherichia coli* O157: H7 in Various Food Samples, Foodborne Pathogens and Disease, **6**, 81-89 (2009).

7）Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P., Blaser, M. J., Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans, J. Infect. Dis., **157**, 472-479 (1988).

8）古田宗宣，小田隆弘，樋脇弘，財津修一，村上光一，馬場愛，江渕寿美，金子孝昌，木原温子，市販鶏肉類における*Campylobacter jejuni/coli, Salmonella*ならびに糞便系大腸菌群の汚染状況の関係，日食微誌，**27**, 200-205（2010）.

研究ノート

食品中の生菌数測定のための内部精度管理試験用試料の評価

細谷　幸恵，川崎　晋，根井　大介，稲津　康弘[§]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所

Evaluation of reference materials for microbiological internal quality control

Yukie Hosotani, Susumu Kawasaki, Daisuke Nei and Yasuhiro Inatsu[§]

National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

The combination of food matrix and bacterium used for internal quality control of viable cell counting was evaluated. The viable cell numbers of each of *Escherichia coli*, coliform (*Enterobacter aerogenes*) and aerobic cells (*Staphylococcus aureus*) contaminated into each of 4 kinds of foods were measured by 8 members. No significant difference of measured viable cell numbers among all of tested samples was observed. Therefore, the combination of each of tested food and bacterium will be applicable for the standard sample for internal quality control of viable cell counting of foods.

Key words: internal quality control; viable cell counts

緒　言

細菌数の測定は，定められた検査法で行った場合でも，その結果が検査実施者の知識，経験あるいは検査室のレベル等によって左右されることがある．細菌検査の精度管理は，検査実施者の技能を正しく評価し，技術水準を維持・向上させるとともに，検査結果の確実性を保証するために，極めて重要な意味を有する．一般に，精度管理は内部精度管理と外部精度管理に大別される．内部精度管理は検査室内での操作が適切に行われ，検査結果が正しいことを証明するために，内部の定められたルールに従って一定の頻度で実施される技能評価である．一方，外部精度管理は第３者機関により定期的に検査室間の検査精度水準を評価し，その施設における検査結果の妥当性を客観的に確認するものである．両精度管理は測定結果の信頼性を維持，向上するための有効な手段となりうる（安井：2004，加藤：2008）．

FAO / WHO合同コーデックス委員会は，食品の輸

[§] 連絡先（corresponding author），inatu@affrc.go.jp

出入に関わる試験室の条件として，(1)妥当性が確認された方法を用いていること，(2)内部精度管理を行っていること，(3)外部精度管理に参加していること，および（4)ISO / IEC17025: 1999の要求事項を満たしていることの４点を挙げている（CAC: 1999）．また食品衛生法に基づき厚生大臣から指定された食品衛生指定検査機関は，同法第19条の４に基づく業務管理基準に合致した精度管理（GLP）の実施が要求される．平成９年１月16日の食品衛生施行令等の改正に伴い「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」（厚生省：1997a）により検査，試験に関する管理基準が示され，都道府県，政令市等の設置する食品検査施設においても管理要領に従って検査を実施することになった．続いて示された平成９年４月１日付「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（別添）「精度管理の一般ガイドライン」（厚生省：1997b）には精度管理の実施方法についての基本的事項が示されており，これには通常検査に供する食品を用いた，通常の培養条件で検出される微生物と検出されない微生物を対象とする試験の実施が定められている．しかし，このガイドラインは概括的なものであって，精度管理用試料の具体的な作成方法や分析方法等に関する詳細な記載はない．

生菌数測定の精度管理試験の実施にあたっては，検出すべき菌の培養液やその凍結乾燥物そのもの，あるいは分析対象となる食品にこれらの検出すべき菌を混入させたものを精度管理用試料として使用することが多い．前者と比較した場合，後者の方がより現実に近い状態で検体中の生菌数を測定していることになるが，一方で，食材によっては元々付着している菌や食品マトリクスの残渣による計数値の誤判定等の問題も生じえる．そこで本研究では物性，色調の異なる複数の食品マトリクスに濃度既知の市販凍結乾燥菌体を混入して作成した精度管理用試料について，内部精度管理試験を複数回実施することにより，精度管理用試料選定の妥当性評価を行った．

実験材料および方法

検体秤量から計数までの一連の操作に伴う誤差が一定範囲に収まっていることを確認することを目的として，農研機構食品総合研究所において研究活動を行っており，同一試験室に所属する８名の作業者を対象として，2008，2009および2012年に試験を行った．試験に使用する試薬および器具は作業者が通常業務に使用しているものと同じものを使用し，試験用の細菌は一定の生菌数が保証された市販凍結乾燥菌体を使用した．また一連の操作は「食品衛生検査指針　微生物編」（厚生労働省：2004）に準拠しつつ，作業者が通常業務で行っているのと同様の方法で行った．

１．PBS乳剤の生菌数測定

以下の方法にて，食品マトリクスの違いの影響を受けない生菌数の測定を行った．３種類（大腸菌 *Escherichia coli*（ATCC 11775），エンテロバクター *Enterobacter aerogenes*（ATCC 13048）および黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*（ATCC 6538））の「Easy QA Ball」（日水）またはその後続品である「Bio Ball」（シスメックス・ビオメリュー）各々１個（約10,000 CFU）を同一の50 mLの滅菌リン酸緩衝液（PBS）に溶解したものを，２本ずつ準備した．各々の原液およびPBS 10倍希釈乳剤をそれぞれ１mLずつシャーレに取り，それぞれの菌に対応した３種類の培地（Merck Coliform Agar，デソキシコレート寒天培地および標準寒天培地）と混釈した．これを室温にて固化させ，35℃のインキュベーターにて24±２時間（大腸菌および大腸菌群）または48±２時間（一般細菌）培養した．Coliform Agar上の紫色コロニー（大腸菌），デソキシコレート寒天培地上の赤色コロニー（大腸菌群：大腸菌＋エンテロバクター）および標準寒天上の全コロニー（一般細菌：大腸菌＋エンテロバクター＋黄色ブドウ球菌）を計数し，これに希釈率を乗じることによって生菌数を求めた．

２．食品混入菌の生菌数測定

３種類の「Easy QA Ball」（または「Bio Ball」）を，菌種ごとに異なる各４種類の食品（10 g）に対して１つずつ混合した検体を，各々２個ずつ作成した．これにPBSを９倍重量加え，ストマッキング処理を１分間行い，PBS乳剤を作成した．以上の作業は食品ごとにランダムに割り当てられた試験者が行い，その際に使用した食品および10倍希釈乳剤の重量を記録した．以上の方法で作成した12種類の検体（各２つずつ）の生菌数を，全ての参加者が30分以内に測定した．測定方法は，前述のPBS乳剤の生菌数測定と同様とした．

３．統計処理

検体母集団の一部を抜き取って得られる生菌数の標本平均は対数正規分布に従うため，コロニー数から算出した検体中の生菌数は，対数化を行った後に必要な

統計処理を行った（Microsoft EXCEL 2003を使用）．Ｚスコアは，試験参加者全員の生菌数測定結果から求めた，各検体の対数化生菌数の平均値および標準偏差を元に算出した．多重比較はTukey-Kramer法により行った（有意水準５％）．

結果および考察

３回の試験において測定したPBS乳剤中の大腸菌，大腸菌群（大腸菌＋エンテロバクター）および一般細菌（大腸菌＋エンテロバクター＋黄色ブドウ球菌）の生菌数の平均値および標準偏差はそれぞれ2.32±0.18，2.45±0.22および2.69±0.20であった．図１に試験数延べ40回（2008年：８名，2009年：８名，2012年：４名．各測定項目につき２反復）の測定値のＺスコアを示した．正規分布に従う母集団から得られた無作為抽出標本のＺスコアが－2.0～2.0および－3.0～3.0の範囲に入る確率はそれぞれ94.55%および99.73%であることから，統計的工程管理においては±2Zおよび±3Zの値が警戒限界値および管理限界値として設定されることが多い（JIS Z 9020: 1999）．本試験室において行った３回の試験においては，ほとんどの測定値のＺスコアが-2.0～2.0の範囲に収まっていたことから，測定はほぼ適正に行われたものと考えられた．

３回の試験において各回８名が測定した，食品マトリクス中の大腸菌，大腸菌群および一般細菌の生菌数と，そのＺスコアをそれぞれ表１および図２に示した．他の食品と比較すると，うずら卵中の大腸菌群数が低めに出ているものの，その差は0.1～0.2 log CFU/g程度であって，実用上の問題はない．また，プロセスチーズや魚肉ソーセージについても使用した製品によっては同様の問題が観察された．なお，これらの食品は，ストマッキングによって作成したPBS乳剤の混濁が著しいため，生菌数の計数が困難であった．これがＺスコアのばらつきの原因の一因となったと考えられた．またカットレタスおよびカットキュウリには添加した大腸菌の少なくとも２桁以上の数の大腸菌群が付着しており，これがColiform Agarではバックグラ
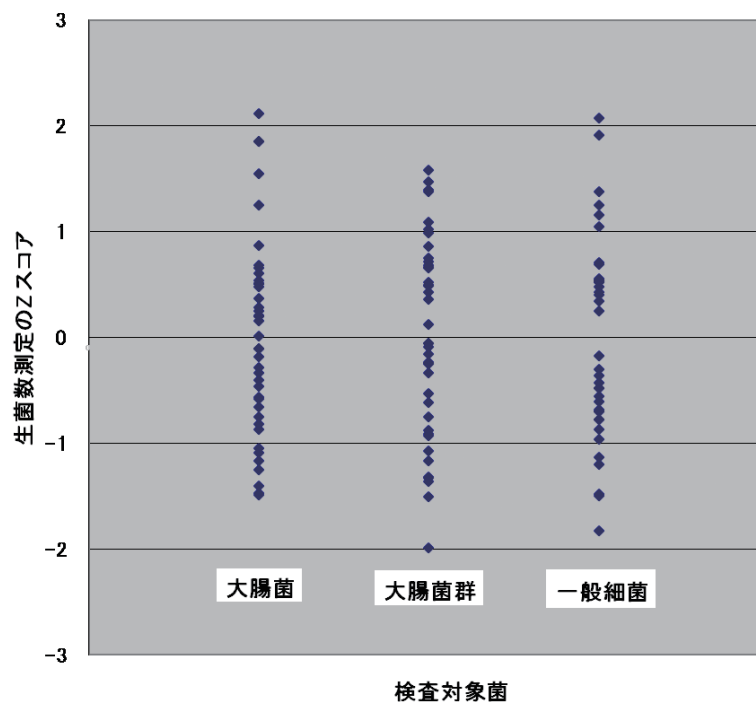
図１．PBS希釈乳剤の生菌数測定より得られたＺスコア

異なる３年に，2.3～2.7 log CFU/mLの菌を含む溶液（２連）の生菌数を測定した．得られた生菌数を対数化した後にそれらの平均値および標準偏差を求め，Ｚスコアを算出した．

表１．食品マトリクスから回収された生菌数

検査対象菌	食品マトリクス	生菌数（log CFU/g）
大 腸 菌	ソーセージ	2.02±0.06 A
	マグロ刺身	2.02±0.06 A
	カットレタス	2.01±0.07 A
	カットキュウリ	2.01±0.06 A
大腸菌群	ウズラ卵水煮	1.70±0.14 B
	魚肉ソーセージ	1.80±0.22 C
	プロセスチーズ	1.92±0.13 D
	ミックスドベジタブル	1.83±0.17 C
一般細菌	ミートボール	1.95±0.10 AD
	ツナフレーク	1.90±0.10 D
	フルーツカクテル	1.90±0.09 D
	煮豆	1.97±0.08 AD

異なる３年に，約２log CFU/gの菌を含むように作成した食品マトリクス（２連）の生菌数を，各８名が測定した．得られた生菌数を対数化した後にそれらの平均値および標準偏差を求めた．生菌数の肩付文字が異なるものは，各生菌数の平均値の間に有意な差がある（有意水準５％）
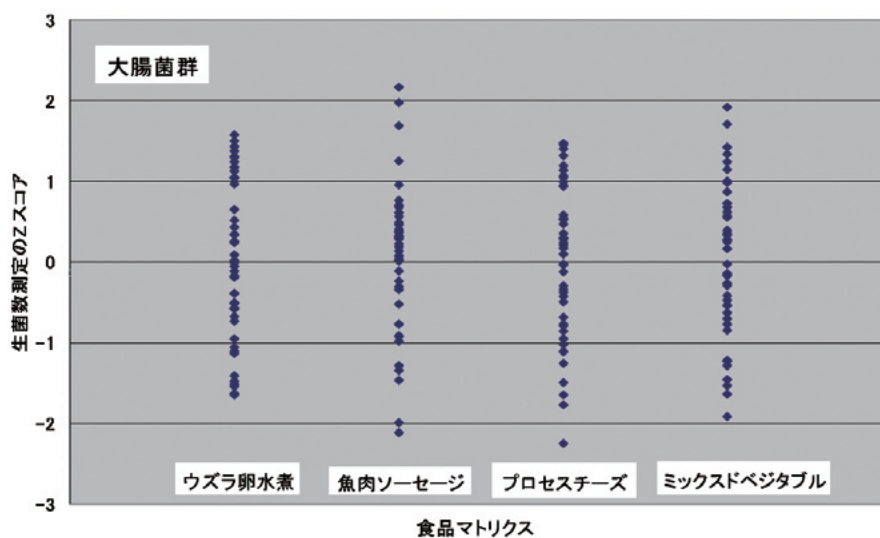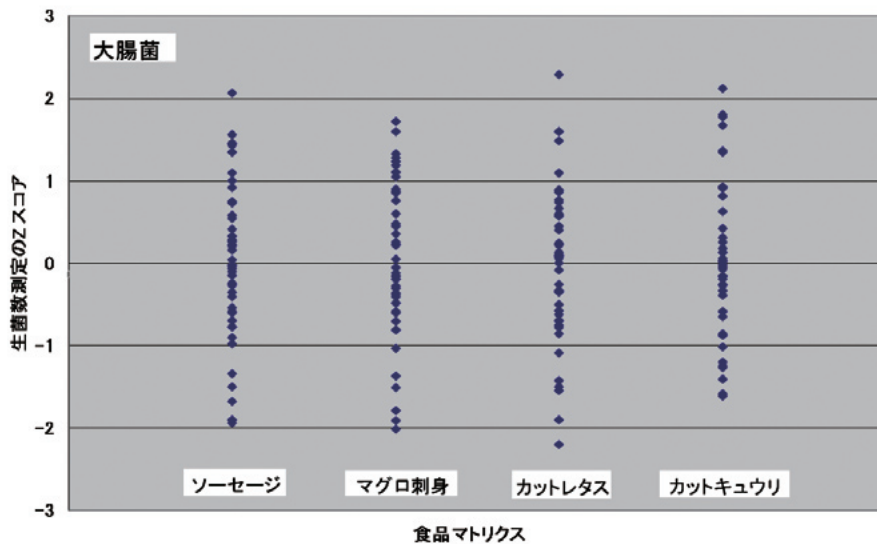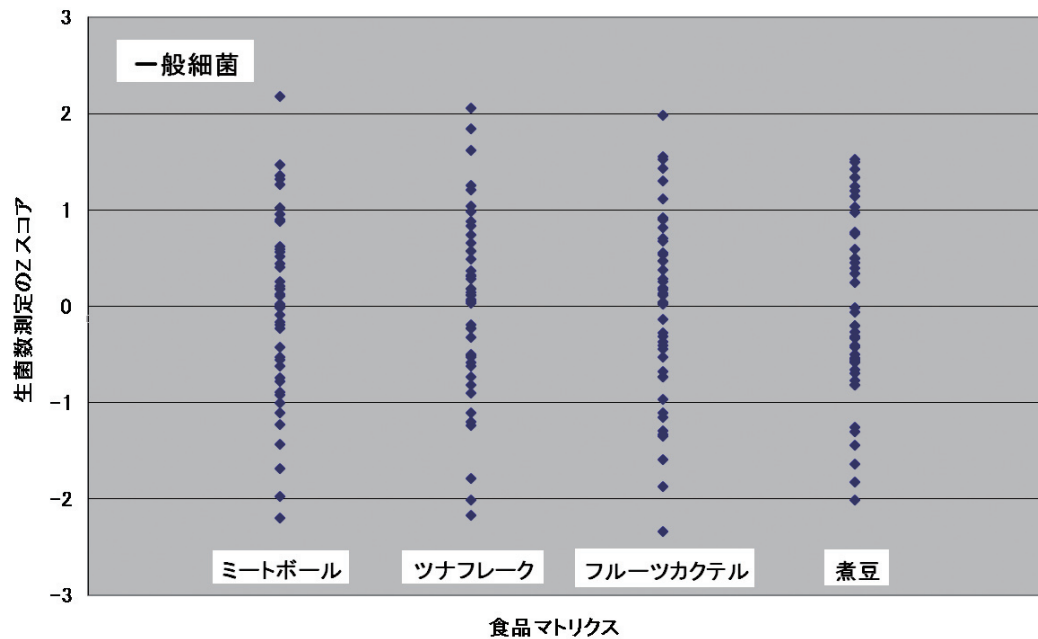
図２．食品マトリクスの生菌数測定値から得られたＺスコア

ウンド（ピンク色のコロニー）として現れることで，大腸菌コロニー計数の妨害となっていた．しかしながら，いずれの食品中の細菌数のＺスコアもおおむね－2.0～2.0の範囲に収まっており，測定はほぼ適正に行われていると考えられた．

以上の結果より，細菌数測定の内部精度管理試験用検体として，表１に示した食品と市販の精度管理用乾燥細菌菌体の組み合わせが利用可能であることが示唆された．

要　約

細菌数測定の内部精度管理試験に用いることが可能な食品マトリクスと細菌の組み合わせについて検討を行った．大腸菌，大腸菌群（大腸菌＋エンテロバクター）および一般細菌（大腸菌＋エンテロバクター＋黄色ブドウ球菌）の市販乾燥菌体を，それぞれ異なる４種類の食品に添加したものを検体として用いて，８名が生菌数の測定を行った．３回の試験の結果，いずれの細菌と食品の組み合わせについても著しい生菌数の差はみられず，Ｚスコアもおおむね－2.0～2.0の範囲に収まったことから，内部精度管理試験用の標準検体として使用可能であることが示唆された．

参考文献

１）安井明美，食品分析における信頼性確保，THE CHEMICAL TIMES. 191(1) 13-18 (2004)．
２）加藤一郎，微生物検査精度管理の実施，食品と技術，3, 10-17(2008)．
３）CAC：Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food., CAC/GL 27 (1999)
４）平成９年１月16日付け衛食第８号厚生省生活衛生局食品保健課長通知「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」, (1997a)．
５）平成９年４月１日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」, (1997b)．
６）厚生労働省（監修），「食品衛生検査指針　微生物編」，(日本食品衛生協会), (2004)．

技術報告

食品害虫サイトの長期間アクセス解析

曲山　幸生§，七里　与子，宮ノ下　明大，今村　太郎，
古井　聡，和田　有史，増田　知尋

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所
〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12

A Long-Term Analysis of Access Trend to Food-Insect Site

Yukio Magariyama§, Kumiko Shichiri, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura,
Satoshi Furui, Yuji Wada, and Tomohiro Masuda

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

It is necessary to analyze the access trends to Food-Insect Site for a long period in order to examine whether the revision of the site affects continuously or not. We made some short-term analyses of the access trends to the site. But it is not impossible to compare the data one another because they were obtained with the different tools. In this study, we made a long-term analysis from April, 2008 to October, 2012 by one method. The result suggests that the effect of the major revision in November, 2010 continues until now (October, 2012). Therefore, we conclude that major revision of the site is not required for the time being. The results of the access analysis have been partially disclosed on Food-Insect Site from November, 2012.

Keywords：ウェブサイト（website），アクセス解析（access analysis），長期間（long term），
食品害虫サイト（Food-Insect Site），公開（disclosure）

緒　言

2007年11月にインターネット図鑑「貯穀害虫・天敵図鑑」を拡張して「食品害虫サイト[i)]」を開設した[1)]．食品害虫サイトの目的は，訪問数の多い貯穀害虫・天敵図鑑を足掛かりに，食総研における食品害虫研究や周辺の情報をわかりやすく紹介することである．さらに，サイト訪問前まで食品害虫の発生を絶対に受け付けなかった人のうちいくらかでも科学的な情報を基に理性的に対応できるようになればよいと希望している．この目的のためにこれまで私たちは様々な活動を

§ 連絡先（Corresponding Author），maga@affrc.go.jp

おこない，その成果をおよそ年１回の頻度で報告してきた[1−4]．

これらの活動の中で重要な役割を果たしているのが食品害虫サイトのアクセス解析である．私たちはサイト内図鑑ページのアクセス解析によって，個々の昆虫が社会でどのように受け入れられているのかを推定できること[1,2]や，ウェブサイトの改訂が期待するアクセス行動を促進しているのかを確認できること[4]を明らかにしてきた．

しかし，これまでの活動では特定の課題に対して個別に短期間のアクセス解析を実施しており，長期間解析したデータを検討するということは考慮していなかった．そのため、その都度解析手法が異なり，それぞれの結果を比較することができない状況だった．そこで今回，さかのぼってサーバログを収集し，長期間のアクセスデータを同一の手法で改めて解析することによって，社会情勢の変化やウェブサイトの改訂による影響が，一時的なものなのか，恒常的なものなのかを判断できるか検討した．

なお，アクセス解析の方法について一般的な解説も加えた．アクセス解析するときの参考になれば幸いである．

方　法

１．アクセス解析（一般的な解説）

ユーザがウェブページ（一般には，URL*1 で表されるHTML*2 ファイルと付属するファイル）を閲覧するとき，最初にブラウザがウェブサーバに閲覧したいページ（HTMLファイル）をリクエストし，次にそれを受けたウェブサーバがリクエストされたファイルを送信する（図１）．ブラウザはそのHTMLファイルを表示しようとするが，通常はさらに付属するファイルが必要で（例えば，図や表示スタイル設定のファイル等），これらを再度ウェブサーバにリクエストし，送ってもらう．これが１件のページ閲覧に相当する．リンクをたどりながら同じウェブサイト内の別ページを連続して閲覧した場合，その一連の閲覧をまとめて訪問（セッションと呼ばれることもある）と呼ぶ．

*1 Uniform Resource Locator．インターネット上のウェブページ等を特定するための記号の並び．
*2 HyperText Markup Language．ウェブページ等を記述するための言語．
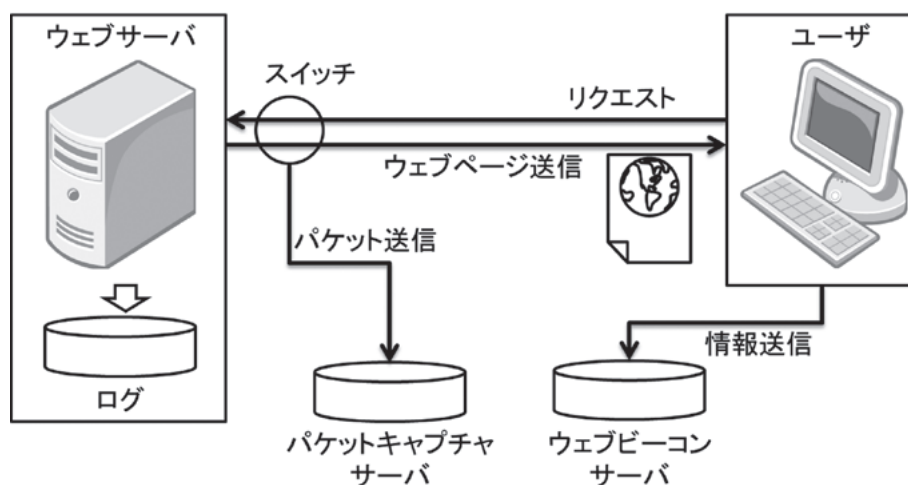
図１．３つのアクセス解析方法

サーバログ型では，ウェブサーバがサーバ内に保存した動作記録（サーバログ）を使って，アクセス解析をおこなう．パケットキャプチャ型では，ウェブサーバとインターネットの間にスイッチと呼ばれる装置を設置する．スイッチによってウェブサーバに流入・流出するデータ（パケット）のうち対象とするものがパケットキャプチャサーバに送信され，このパケット記録を使ってアクセス解析をおこなう．ウェブビーコン型では，ユーザがウェブページを閲覧した時にアクセス情報をウェブビーコンサーバに送信するようにプログラムされたJavaScriptを各ウェブページに埋め込み，ウェブビーコンサーバに保存された情報を使ってアクセス解析をおこなう．

ユーザの閲覧や訪問行動（全体をアクセス行動と呼ぶ）について，5W1H（Who，What，When，Where，Why，How）をできるだけ正確に解析しようというのがアクセス解析である．

アクセス解析には大きく分けると３つの方法がある[5)]．「サーバログ型」「パケットキャプチャ型」「ウェブビーコン型」である．情報を取得する位置と種類が異なるので，それに応じた特徴がある（表１，図１）．

サーバログ型はウェブサーバに記録されたサーバログ（表２）を解析する．農研機構のウェブサーバソフトは世界中で最も多く使用されているApacheで，そのログから様々な情報を獲得，あるいは推測できる．例えば，参照元情報が検索サイトから「バクガ」を検索したことを示していれば，ユーザはバクガに興味があることを推測できる．大きな長所は，ウェブサーバは必ずサーバログを保存しているので，アクセス解析ツール導入前の期間にさかのぼって解析することが可能だということである．これはパケットキャプチャ型とウェブビーコン型には不可能である．しかし，サーバログはウェブサーバの動作記録なので，サーバに届かないユーザの挙動は解析することができない．例えば，ユーザが前のページを閲覧するためにブラウザの「戻る」ボタンを押した場合，ユーザPC内のキャッシュに保存されたファイルが表示されるので，サーバはこの挙動を感知することができない．また，一般にログファイルは容量が巨大で，取り扱いが不便であるというデメリットもある．

インターネット上を流れる情報はパケットと呼ばれる単位で操作される．つまり，決まった大きさ以上の情報は，複数のパケットに分割されて伝送される．パケットキャプチャ型ではサーバを出入りするパケットをパケットキャプチャサーバ（記録解析用のサーバ）に送信する装置を設置する．対象とする情報だけを取得・蓄積するので，データ容量は小さく，リアルタ

表１．３大アクセス解析方法の特徴

項　目	サーバログ型	パケットキャプチャ型	ウェブビーコン型
代表的な製品 （*無料ツール）	Analog* Webalizer* SiteTracker Urchin	RTmetrics	Google Analytics* Yahoo! アクセス解析* SiteCatalyst Visionalist
導入の手間	○ ・集計用サーバの準備	× ・専用装置の設置	× ・JavaScript タグの埋め込み
導入前情報の解析	○ ・ログファイルさえあれば可能	×	×
正確な挙動追跡	×	△ ・動的ページに対応	○ ・キャッシュからの閲覧も捕捉 ・ページ完全読込み，動的ページに対応
機械的なアクセス	○	○	× ・検索エンジンクローラの情報を入手できない
リアルタイム性	× ・ログファイルを構築する頻度に依存	○	○
データ容量	× ・ログファイルが巨大	○	○
データの所有権	○	○	× ・データ収集サーバはベンダーが所有
分散サーバ対応	× ・全サーバのログファイルが必要	△ ・同一ネットワークにあれば最上位に専用装置を置けばよい	○ ・考慮しなくてよい

表2．ウェブサーバログの例

項　目	例	意　味
Host	150.26.36.49	ユーザのIPアドレス
Remote Log	–	（通常は使用しない）
User ID	–	ユーザID 情報がない場合が多い．
Date & Time	[01/Apr/2008:17:57:56 +0900]	処理日時 左の例では，2008年4月1日17時57分56秒に処理が終了したことを表している．
Request	"GET /yakudachi/gaichu/zukan/index.html HTTP/1.0"	リクエストの内容 左の例では，害虫図鑑トップページを要求したことを表している．
Status Code	200	HTTPステータスコード サーバがユーザに送り返すコード．200は処理が成功したことを表している．
Size	13421	転送容量（バイト）
Referer	"http://search.yahoo.co.jp/earch?p=%E3%83%90%E3%82%AF%E3%82%AC&search_x=1&tid=top_ga1&ei=UTF-8&pstart=1&fr=top_ga1&b=11&qrw=0"	参照元情報 ユーザがリクエストの直前に閲覧していたページのURLと付加情報から構成される．左の例では，Yahoo!Japan検索サイトで「バクガ」を検索したことを表している．ブラウザ（携帯等）によっては，情報がない場合がある．
User Agent	"Mozilla/4.0 (compatible; MSIE 6.0; Windows NT 5.1; SV1; .NET CLR 1.1.4322)"	ユーザエージェント ユーザのウェブページ閲覧環境に関する情報．左の例では，Internet Explorer（Ver.6）を使っていることを表している．

農研機構ウェブサーバ（ウェブサーバソフト：Apache）の場合を示した．

イム性に優れている．同じURLでも違う表示をする動的ページを分析することもできる．しかし，ウェブサーバとインターネットの間に専用の装置を設置する必要があるため，レンタルサーバ*[3]等ハードウェア環境の変更ができない場合は導入することができない．

ウェブビーコン型では，ユーザがウェブページを表示するたびにその情報がウェブビーコンサーバ（データ収集用のサーバ）に送信されるようになっている．この機能を実現するために，アクセス解析者は各ウェブページにその機能を実現するJavaScript*[4]を埋め込む．したがって，原理的にユーザのページ閲覧行動をすべて捕捉することができる。パケットキャプチャ型と同様に，同じURLでも違う表示をする動的ページを分析することもできる．アクセス解析の目的が，ウェブサーバの運営管理から，ウェブサイトの目的達成（例えば，売上促進等）に対する最適化に移ってきた近年，ユーザ動向分析に制限のあるサーバログ型からウェブビーコン型に主流が移りつつある．しかし，JavaScriptはプログラムであるため，その動作が保証されるまで十分に吟味する必要があり，準備不足で導入するとウェブページの表示が不安定になるリスクが高い．また，取得可能な情報の種類はサーバログ型よりも多い反面，プライバシーへの配慮が特に重要な方法であると言える．

なお，アクセス解析結果は上記の3分類間で異なるだけでなく，サーバログ型の中でも排除する情報（サイト運営管理用のアクセスや検索サイトのクローラ*[5]等）の範囲や情報の解釈（戻るボタン等の操作があったことを想定するか等）の違いから，同じ指標でも最終的に得られる結果（数値）が異なる．つまり，同じ

*[3] ホスティングサーバとも言う．複数の利用者が使用するサーバ．

*[4] 動的ウェブページ等を作成するために用いられる簡易プログラミング言語．

*[5] ウェブページやそれに含まれる図などを自動的に取得し，データベース化するプログラム．

方法で解析された結果の間でしか比較することはできない.

2．アクセス解析の方法

ここでは過去にさかのぼって解析がおこなえることを重視し，サーバログ型アクセス解析方法を採用した．用いた解析ソフトウェアは，アクセス解析に関する書籍[5]を参考にして独自に開発した既に報告した方法（曲山他，2012）[4]である．食品害虫サイトは2010年10月と2012年４月にサーバの移転をしたので（表３），サーバログも対応するサーバから入手した．2008年３月以前のサーバログは入手できなかったため，解析したデータは2008年４月以降のものである．

結果および考察

1．図鑑ページの閲覧数

以前発表したとおり，図鑑ページの閲覧数から対象とする害虫の社会的な注目度を推定することができる[2]．図２は，図鑑ページのうち閲覧数が多い順に５ページの日別閲覧数の動向を示したグラフである．貯穀害虫・天敵図鑑に掲載されている害虫のうち，コクゾウムシ，ノシメマダラメイガ，コクヌストモドキ，タバコシバンムシ，ヒメカツオブシムシの順に社会の注目度が高いと推定できる．さらに詳しく見ると，①夏に閲覧数が多くなるという季節変動が見られることから，害虫の発生が多くなり人の目に触れやすくなると注目されること，②突発的に閲覧数のピークが見られることから，マスコミやインターネット上のメディアで特定の害虫が採り上げられると多くの人の関心を引くということがわかる．これらは2010年に発表した論文[2]で詳細に解析した．なお，2009年４月から６月の３か月間閲覧数が少なかったが，この原因は不明である．

長期的に見ると，2011年以前に比べると2012年の閲覧数が増加している．つまり，2011年以前は季節変動も考慮すると安定した閲覧数だったので，この５種の食品害虫に関して注目度はほとんど変化していないと考えられた．2012年になって５種の食品害虫の注目度を上昇させるような事件があったのだろうか．しかし，社会的な事件の影響による閲覧数の増加は一時的な現象であることが報告されている[2]．私たちは，この直接の原因が各害虫の注目度が上昇したためではなく，１訪問の間に害虫サイト内のページをより多く閲覧するようになった（図６参照）ためであると考えている．詳細な考察は後述する（「ページ間移動」参照）．

2．検索語

これまでのアクセス解析結果によると食品害虫サイト訪問者のうち約半数は検索サイト経由であった（図５参照）．したがって，検索語[*6]の動向をモニターすることにより，そのキーワードの注目度の変化に気付くことができる．これをきっかけにして他の情報を集中的に調べれば社会的背景を推測できる．

図３は2008年11月（上図）と2009年１月（下図）の月別検索語ランキングをグラフ化したものである．2009年１月のコクヌストモドキが異常に多い．図４に解析した全期間にわたって「コクヌストモドキ」という検索語が現れた件数を示した．以前報告したように[2]，コクヌストモドキの同性愛行動が話題になったのは2008年11月であり，コクヌストモドキの図鑑ページ閲覧数も2008年11月６日にピーク（2649件／日）となった．しかし，検索数は2009年１月がピーク（3379件／月）であった．Google Trendsで「コクヌストモドキ」を調べると，食品害虫サイトと同様に2009年１月

*6 検索サイトで検索のために使ったキーワードのこと．検索サイトでは複数の検索語を空白で区切って検索することができるが，この場合は通常すべての検索語を含むという条件を表す．検索サイトの入力欄に記述された，検索語と空白からなる文を検索クエリと言う．

表 3．食品害虫サイトのサーバ

期　間	図　鑑	図鑑以外
2007年11月－2010年10月	食総研サーバ	EgoChatサーバ*
2010年11月－2012年３月	食総研サーバ	
2012年４月－（現在）	農研機構サーバ	

*農林水産研究情報総合センター提供の研究者向けサーバ（通称，バーチャルラボシステム）を利用した．2009年６月下旬より食品害虫サイトのコンテンツのひとつである「食品害虫クイズ」を，食品害虫サイトのフォルダに統合した．
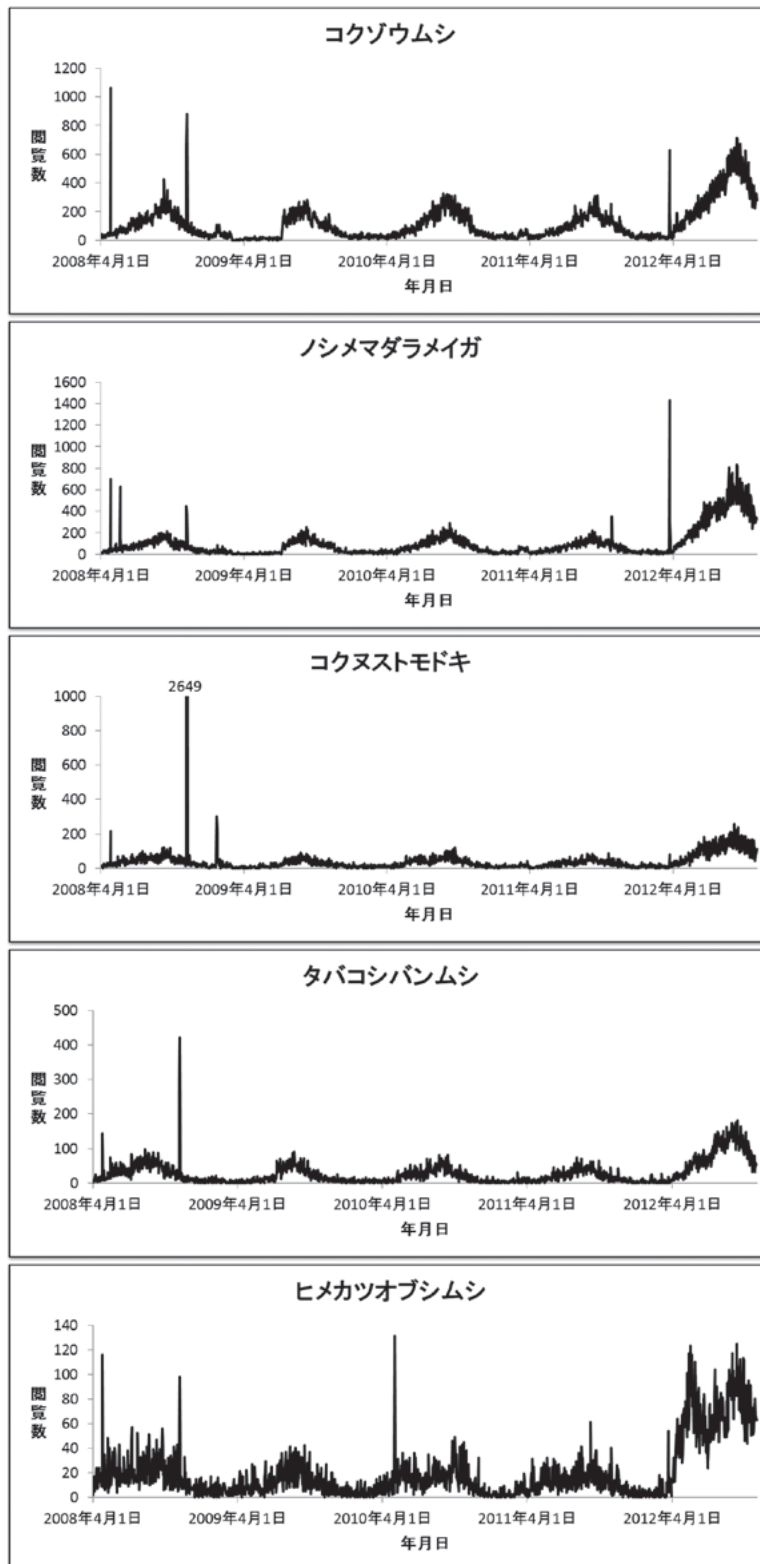
図２．図鑑ページの閲覧数

図鑑ページのうち閲覧数が多い順に５ページの１日閲覧数の動向をグラフで示した．周期的な季節変動に加えて，ときどき急峻なピークが現れる．2008年４月25日や2008年11月６日のように，別の虫で同じ日にピークが出現する場合もあった．
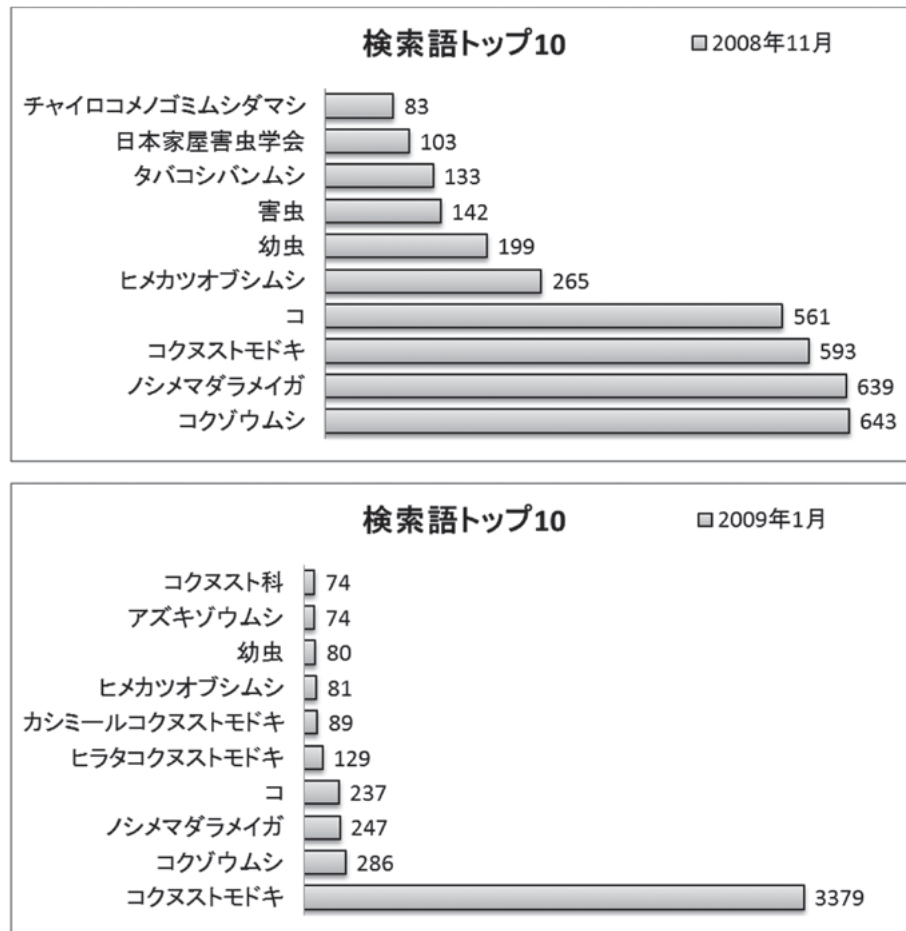
図３．2008年11月と2009年１月の検索語トップ10
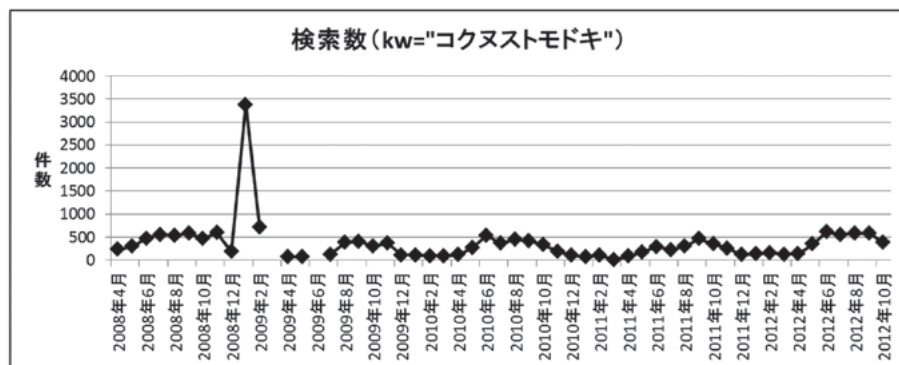
図４．「コクヌストモドキ」を検索語とした件数

2009年３月と2009年６月はトップ10に入らなかったために点がない．

にピークが出ていた．２カ月ほど遅れて検索数が増えたのは，このケースに特有のことなのか，一般的なことなのか，興味深い．ちなみに，ノシメマダラメイガの図鑑ページ閲覧数は2012年３月22日にピークが見られたが，その後特に「ノシメマダラメイガ」の検索件数の増加は見られなかった．

３．訪問者の参照元

どのような経路で食品害虫サイトを訪問したのかが明らかになれば，訪問目的や方法を推察する材料となり，食品害虫サイトの改良方針を決定するのに役立つ．図５は月別参照元のグラフである．

極端に参照元が変化していたのは，2011年３月と2012年３月である．2011年３月は東日本大震災が発生した月で，それがアクセス行動の変化と関係したと考えられる．具体的には，その他のサイトと検索サイトからの訪問が極端に減少し，不明が約60%に増加している．通常時の食品害虫サイトの場合，携帯等モバイル端末からのアクセスが全訪問中の約10%含まれている．古い携帯端末等からのアクセスは参照元が不明になるので，震災後にPCの利用が困難なために携帯でのアクセスが増えた可能性もある．残念ながら，東日本大震災の影響によるサーバの不調のため，2011年３月のサーバログのユーザエージェント（利用ブラウザ等の情報）は消失していた．このため上記の仮説を確認することはできなかった．一方，2012年３月に一般外部サイトからのアクセスが急増したが，大部分はブログ「哲学ニュース nwk」（http://blog.livedoor.jp/nwknews/）の記事「知らない方が幸せだった雑学『空対空最強の昆虫三つ巴』」からのアクセスであった．

また，食品害虫サイトの大幅改訂のあった2010年11月以降食総研ページから食品害虫サイトへの流入割合が増えていたが，食総研サイトが農研機構サイトの様式に統一された2012年４月からその割合が減少した．これは，食総研サイトのトップページに掲載されていた食品害虫サイトへのリンクがわかりにくくなった可能性が考えられる．
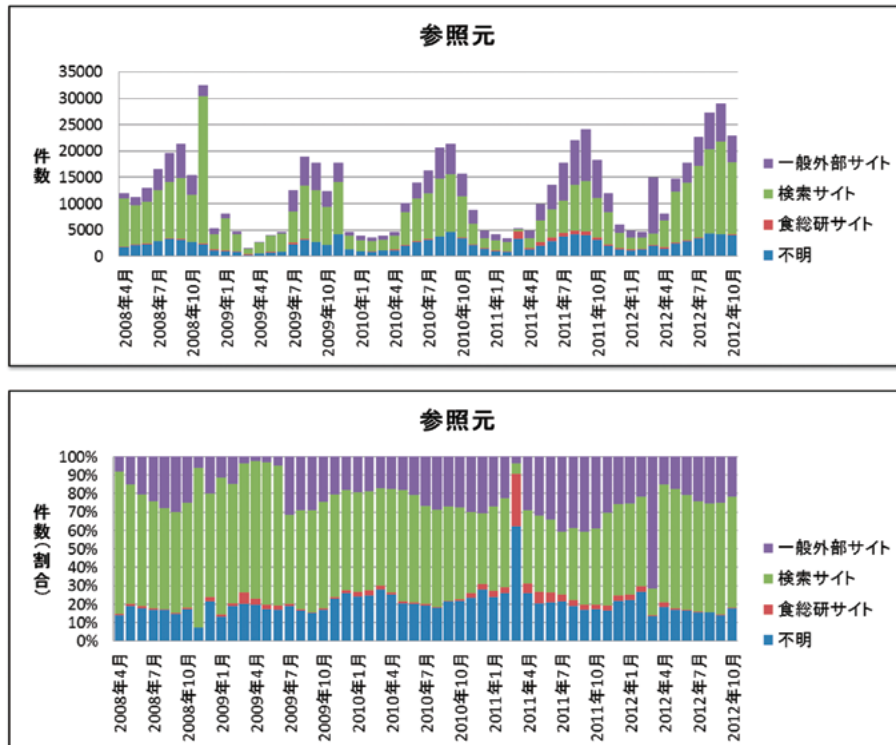
図５．月別訪問参照元

各訪問に対して参照元を，不明，食総研サイト，検索サイト，一般外部サイトの４つに分類した．上図が件数，下図が割合を示す．

4．ページ間移動

訪問者がサイト内のページをどのように移動したかという情報は，サイトを改良したい運営者にとって重要である. 図６は月別ページ間移動数のグラフである.

図５と同様に，2011年３月と2012年３月に通常の月とは違う傾向が見られた．2011年３月は図鑑以外のページの間で移動している件数が極端に多い．通常は全移動のうち5−10% 程度なのに対して、2011年３月は20% に達していた。参照元のデータから東日本大震災の影響による携帯からのアクセス増加の可能性を指摘したが，この現象も携帯からのアクセス増加の影響によるものかもしれない．つまり，携帯ユーザとPCユーザの間でアクセス行動が異なっていることを示している可能性がある.

2012年３月は外部から図鑑以外のページへ，図鑑以外から外部への移動が異常に増加していた．該当する図鑑以外のページはコラム「米びつ害虫の勘違い」で，ブログ「哲学ニュース nwk」（http://blog.livedoor.jp/nwknews/）の記事「知らない方が幸せだった雑学『空対空最強の昆虫三つ巴』」に載っていたリンクをたどった訪問が大きな割合を占めていた．2012年３月22日の図鑑ページ「コクゾウムシ」，「ノシメマダラメイガ」（図２）の閲覧数ピーク，2012年３月の一般外部サイトからの訪問数のピークも見られ，これらの現象の原因が上記の記事だと考えられる．人気ブログに掲載された記事の影響の大きさを示す事例である.

食品害虫サイトは2010年11月に大幅改訂をおこなった[4]．図６によると，この大幅改定以降,「図鑑以外→図鑑以外」,「図鑑以外→図鑑」,「図鑑以外→外部」,「図鑑→図鑑以外」,「外部→図鑑以外」の移動の割合が増加している．つまり，食品害虫サイトにおいて図鑑以外のページの重要性が増したと言える.

2012年４月以降には,「図鑑→図鑑」をはじめサイト内ページ間の移動の絶対数が増えた．これは図鑑ページの閲覧数が2012年になって増加した（図２参照）時期と同じである．2012年４月に食総研サイト[iii]が農研機構サイト[iv]の統一様式に改訂されたが，それとの関係は不明である．東日本大震災が発生した2011年３月以降，食品害虫よりも大震災に関係した事柄に対する関心が高かったため閲覧数が期待したほどには増加せず，大震災の影響が小さくなった2012年になって食品害虫サイト改訂の効果が顕著に現れてきたの
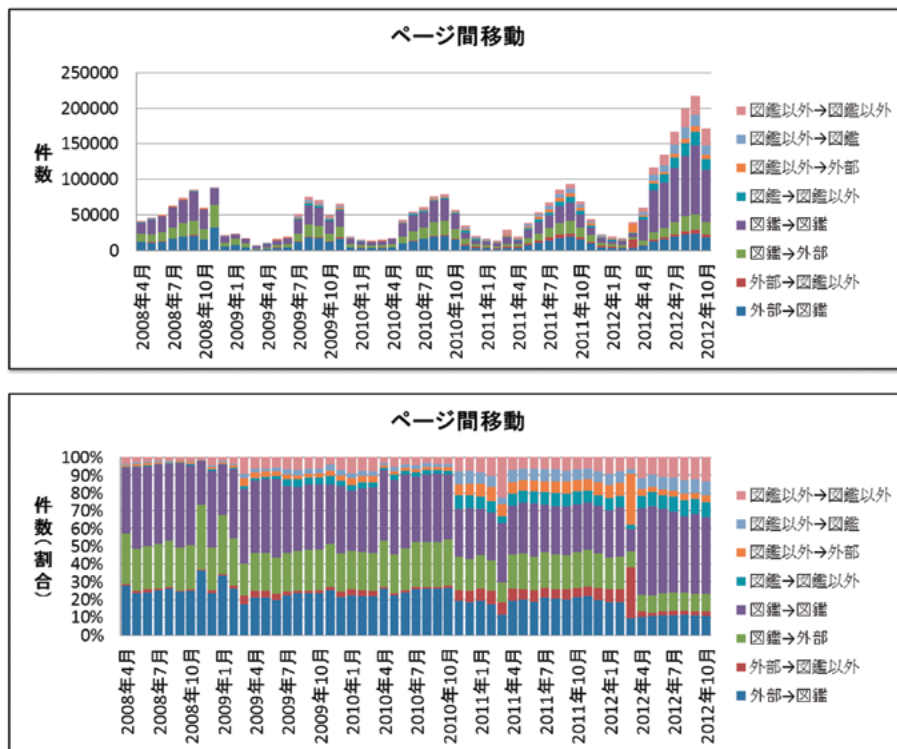
図６．ページ間移動

かもしれない．仮にそうであれば，改訂の効果は約２年という長期にわたって継続しており，これからも続く可能性が高いと言える．したがって，今後しばらくは食品害虫サイトの大幅改訂の必要はないと考えられる．

５．アクセス解析結果の公開

長期間のアクセス解析によって推測できることがあることが明らかになった．例えば，閲覧数の増加が単なる揺らぎなのか，一時的なものなのか，継続的なものなのかを知るためには，ある程度の長い期間の解析結果の中で判断する必要がある．このようなデータは食品害虫サイト訪問者にとっても利用可能な有用なものであると考え，今回解析したデータの一部を，2012年11月19日より食品害虫サイトで公開している．公開しているアクセス解析データは，図鑑ページの毎日の閲覧数（図７）と，検索語の月別ランキング（10位まで）（図８）である．これらのデータはそれぞれ個別のシートに記載し，ひとつのExcelファイルにまとめてあり，食品害虫サイトアクセスランキングページ[ii]からダウンロードできる．このファイルには毎月新しいデータを追加しているので，興味のある方はアクセスしてほしい．

要　約

食品害虫サイトの改訂や食総研サイトの農研機構サイト統一様式の採用等の効果が一時的なものなのか，継続的なものなのかを確認するためには，長期間のアクセス解析が必要である．食品害虫サイトのアクセス解析に関して，これまでは短期間の解析のみをおこなってきたためその都度異なるアクセス解析ツールを採用し，データ間の比較ができなかった．今回は2008年４月から2012年10月までの４年６か月間のアクセス解析を改めておこなった．その結果，2010年11月に実施した食品害虫サイト大幅改訂の効果は現在も継続していると考えられた．したがって，しばらくは食品害虫サイトを大幅改訂する必要はないと結論できた．

このような長期アクセス解析データは食品害虫サイト利用者にも有用であると考えたので，2012年11月よ

	A	B	C	D	E
1	年月日	コメノゴミムシダマシ	クロゴミムシダマシ	フタオビツヤゴミムシ	ガイマイゴミムシダマ
2	2008年4月1日	1	0	1	0
3	2008年4月2日	1	0	1	2
4	2008年4月3日	1	0	1	3
5	2008年4月4日	5	2	0	2
6	2008年4月5日	1	0	0	1
7	2008年4月6日	0	0	0	0
8	2008年4月7日	7	5	2	2
9	2008年4月8日	5	3	1	2
10	2008年4月9日	5	2	2	2
11	2008年4月10日	5	5	2	6
12	2008年4月11日	6	1	1	3
13	2008年4月12日	1	0	0	0
14	2008年4月13日	1	0	4	1
15	2008年4月14日	1	1	2	8
16	2008年4月15日	3	0	1	0
17	2008年4月16日	4	3	1	4
18	2008年4月17日	5	0	4	6
19	2008年4月18日	13	1	6	12
20	2008年4月19日	7	3	2	1
21	2008年4月20日	5	3	2	4
22	2008年4月21日	5	3	12	4
23	2008年4月22日	7	15	3	7
24	2008年4月23日	7	7	3	4
25	2008年4月24日	2	2	0	4
26	2008年4月25日	47	49	24	45
27	2008年4月26日	8	11	1	2
28	2008年4月27日	2	7	1	3
29	2008年4月28日	12	6	6	10
30	2008年4月29日	14	2	5	10
31	2008年4月30日	2	1	0	8

図７．図鑑ページの日別閲覧数

	A	B	C	D	E
1	年月	1位検索語	2位検索語	3位検索語	4位検索語
2		1位件数	2位件数	3位件数	4位件数
3	2008年4月	コクゾウムシ	コ	ヒメカツオブシムシ	ノシメマダラメイガ
4		464	421	401	295
5	2008年5月	コクゾウムシ	コ	ヒメカツオブシムシ	ノシメマダラメイガ
6		884	802	664	542
7	2008年6月	コクゾウムシ	コ	ノシメマダラメイガ	タバコシバンムシ
8		1032	895	687	532
9	2008年7月	コクゾウムシ	コ	ノシメマダラメイガ	タバコシバンムシ
10		1323	1144	1007	859
11	2008年8月	コクゾウムシ	コ	ノシメマダラメイガ	タバコシバンムシ
12		1554	1356	1165	1081
13	2008年9月	コクゾウムシ	コ	ノシメマダラメイガ	タバコシバンムシ
14		1774	1536	1321	1001
15	2008年10月	コクゾウムシ	コ	ノシメマダラメイガ	ヒメカツオブシムシ
16		1356	1226	999	484
17	2008年11月	コクゾウムシ	ノシメマダラメイガ	コクヌストモドキ	コ
18		643	639	593	561
19	2008年12月	コクゾウムシ	ノシメマダラメイガ	コ	コクヌストモドキ
20		366	346	305	186
21	2009年1月	コクヌストモドキ	コクゾウムシ	ノシメマダラメイガ	コ
22		3379	286	247	237
23	2009年2月	コクヌストモドキ	ノシメマダラメイガ	コクゾウムシ	コ
24		718	310	255	219
25	2009年3月	ノシメマダラメイガ	害虫	貯穀害虫	図鑑
26		96	79	59	55
27	2009年4月	ノシメマダラメイガ	害虫	コクヌストモドキ	貯穀害虫
28		129	100	79	77
29	2009年5月	害虫	日本家屋害虫学会	図鑑	貯穀害虫
30		155	142	121	112
31	2009年6月	害虫	日本家屋害虫学会	図鑑	ノシメマダラメイガ

図８．月別検索語ランキング（10位まで）

り一部のデータを食品害虫サイト上で公開している．また，本報告ではアクセス解析の方法について簡単に解説した．

参考文献

1）曲山幸生，七里与子，宮ノ下明大，今村太郎，食品害虫サイトの開設とそのアクセス解析，家屋害虫，vol.31, no.2, pp.93-99（2009）．

2）曲山幸生，七里与子，宮ノ下明大，今村太郎，アクセス解析から推定した注目度と浸透度，農業情報研究，vol.19, no.1, pp.109（2010）．

3）曲山幸生，七里与子，宮ノ下明大，今村太郎，和田有史，増田知尋，木村敦，ウェブアンケートによる食品害虫サイト利用状況調査，食品総合研究所研究報告，no.75, pp.55-61（2011）．

4）曲山幸生，七里与子，宮ノ下明大，今村太郎，和田有史，増田知尋，木村敦，食品害虫サイトの大幅改訂による訪問者のアクセス行動の変化，食品総合研究所研究報告，no.76, pp.59-66（2012）．

5）衣袋宏美，PROFESSIONAL アクセス解析，技術評論社，ISBN978-4-7741-4633-1，2011年発行．

参考ウェブページ

i）独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，食品害虫サイト，http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/index.html,（2012.10.19）．

ii）独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，食品害虫サイトアクセスランキングページ，http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/ranking_00.html,（2012.10.19）．

iii）独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，食総研サイト，http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/index.html,（2012.10.19）．

iv）独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，農研機構サイト，http://www.naro.affrc.go.jp/index.html,（2012.10.19）．

技術報告

麹菌の分生子形成における光応答

鈴木　聡，楠本　憲一[§]

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所
〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12

Respons to light in conidiation of Aspergillus oryzae

Satoshi Suzuki, Kenichi Kusumoto[§]

National Agriculture and Food Research Organization, Food Research Institute
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

Aspergillus oryzae is important industrial microorganism used in not only traditional Japanese fermentation food production but also industrial enzyme production. *A. oryzae* responds to light. We studied the light response of *A. oryzae* on conidiation. *A. oryzae* produces more conidia in dark culture than light culture.

Keywords: *Aspergillus oryzae*，分生子，光応答

緒　言

麹菌*Aspergillus oryzae*は我が国の伝統醸造産業に欠かせない産業微生物であり，また昨今のバイオテクノロジーの発達に伴って，有用な産業用酵素の分離源としても注目されている．伝統醸造産業で用いられる固体培養においても酵素生産のためのファーメンターに用いられる液体培養においてもスターターとして接種されるのが分生子，すなわち「もやし」であり，無性的に形成される胞子である．実験室レベルで麹菌を液体培地，あるいは固体培地に接種する際には，分生子懸濁液が用いられる．液体・固体どちらの培養実験においても，初発接種分生子量を十分に確保することが重要であり，接種分生子量が少ないと培養後に必要な菌体量を得ることが出来ない．そのため，十分に分生子を含んだ分生子懸濁液を実験に用いることが重要である．実験室における保存菌株を作成する際には斜面培地にて麹菌を十分に生育させ，多量に分生子を形成させた後，低温に移して長期保存菌株とするが，分生子の着生が不十分であると生存率が低下するという問題が生じる[1)]．では，分生子を多量に得るためにはどのようにしたらよいのだろうか．

Hatakeyama *et al.*[2)]は，赤色光は*A. oryzae*の分生子

[§] 連絡先（Corresponding Author），kusumoto@affrc.go.jp

形成を抑制し，青色光は分生子発芽及び菌糸生長を阻害することを報告している．そのため麹菌は暗い場所で良好に生育し，かつ分生子をよく形成する．我々も日常的な培養経験から白色蛍光灯下において，Hatakeyama *et al*. が指摘したような麹菌光応答の存在を認識している．一方，麹菌以外の*Aspergillus*属菌，例えば*A. nidulans*, *A. flavus*[3]においては，白色光は分生子分化を促進し,暗培養は分生子形成に抑制的に働く．そもそも，自然状態において糸状菌は主に土壌中，すなわち暗黒で高湿度かつ低酸素の環境に生息し，主に有性生殖と二次代謝を行うが，何かのきっかけで地表に達すると，そこで，光（特に有害なのが紫外線），乾燥ストレス，酸化ストレスにさらされ，分生子形成を行うと考えられている[4]．何故麹菌だけが他の近縁種と逆の反応を光に対して行うのかは解っていない．また，麹菌がどのような分子機構を介して赤色光あるいは青色光を受容し，どのように細胞の生理状態が変化することにより光応答の現象が現れるのかも明らかになっていない．また，他の糸状菌が持つ，青・近紫外，あるいは緑色光といった他波長の光への受容体の働きも明らかではなく，麹菌の光による分生子形成制御機構の全容は今後の解明が期待されている．

近年，*Neurospora crassa*あるいは*A. nidulans*等のモデル糸状菌の研究において光が糸状菌の分生子形成と二次代謝及び有性生殖の切り替えを行う分子機構が明らかになりつつある．*N. crassa*においてはWhite-Collar複合体（WCC）と呼ばれる青色光受容体を介した分生子形成や概日リズム遺伝子の調整等の機構が詳細に明らかとなってきた[5]．また，*A. nidulans*においては青色光と赤色光は相加的に分生子形成を誘導することが知られている．青色光の受容にはWCCを構成するWC-1及びWC-2のそれぞれのオルソログLreA及びLreB，また赤色光の受容にはPhytochromeであるFphAの関与が示唆されており，LreA及びLreBはFphAと複合体を作ることが解っている．光による分生子形成・有性生殖の切り替えにおいては，LreBとFphAは分生子形成と有性生殖の切り替えの鍵となるvelvet制御タンパク質VeAと複合体を作り[6]，VeAは二次代謝の制御タンパク質であるLaeAと共に，別のvelvet制御タンパク質VelBとヘテロ三量体を形成することが解っている[7]．また，VelBはさらに別のvelvet制御タンパク質VosAとヘテロ二量体を形成するが，VosAは分生子形成を抑制する．velvetファミリータンパク質は，担子菌，子嚢菌から接合菌に至るまで多くの糸状菌に広く保存されており，特徴的なvelvetドメインを持つが，糸状菌以外の生物には存在しない糸状菌特異的制御タンパク質である．現在知られる４つのグループ，VeA，VelB，VelC及びVosAのうち，最初にVeAのポイントミューテーションを持つ*veA1*変異株が赤色光の照射無しに暗黒下で多数の分生子を形成する変異株として報告された[8]．近紫外光受容体cryptochromeであるCryAは有性生殖を抑制する[9]．またopsinと予想されるNopAは緑色光の受容に働くと想像されるが，その機能は明らかでない．

上記*A. nidulans*の光応答に関わるタンパク質をコードする遺伝子のほとんどは一揃い*A. oryzae*染色体上にオルソログが存在する[4]．従って，基本的な光受容機構は*Aspergillus*属菌内で保存されているが，その信号伝達の仕方に*A. oryzae*の特色があるのではないかと想像される．しかしながら，*A. oryzae*の特異な光反応，すなわち非常に近縁な*A. flavus*も含めた*Aspergillus*属菌に対して完全に逆転している点についての再現性に強い疑念を持つグループが海外に存在する．そこで我々は，*A. oryzae*の分生子形成における光応答を我々自身の実験室において我々自身の手において再現できるかどうかをまず最初に検討し，あわせて培養時の湿度，通気条件についても検討したので技術報告とする．

実験方法

１．菌株，培地及び培養条件

Aspergillus oryzae RIB40（NFRI1599）を用いた．培地は，ツアペックドクス（CD）（１% glucose，0.6% $NaNO_3$，0.1% KH_2PO_4，0.1% trace element solution，0.05% KCl，２mM $MgSO_4$），及びポテトデキストロースアガー（PDA）（Difco）を用いた．trace element solutionの組成は0.1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$，0.88% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.04% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.01% $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$，0.005%（NH_4）$6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$である．CD寒天培地はCDに２% アガーを加えた．薄めの平板培地は９cmシャーレ１枚あたり約20 ml弱の培地を注いだ後30分から１時間程クリーンベンチ内で通風状態にて乾燥させた．厚めの平板培地は９cmシャーレ１枚あたり約30 ml弱の培地を注いだ後寒天が固まり次第すぐに蓋をした．培養は30℃培養室あるいは湿度100% 温度30℃に設定した恒温恒湿槽で行い，24 W卓上蛍光灯の下で蛍光管（FHF24SEN3波長形昼白色　色温度5000K）からの距離は約30 cmとした．その条件における平板培地表面付近の光量子束密度は約

30 μmol m^{-2} s^{-1}であった．分生子は一旦分生子懸濁液（0.5% NaCl，0.002% Tween80）とし，約10^6個をマイクロピペットにて平板培地中央に滴下した．

２．菌糸生育観察

菌糸生育の観察は平板培養におけるコロニー直径により評価した．コロニー直径の計測は１サンプルあたりコロニーの中心を通る直交する２本の直線を直径とした平均値とし，それぞれ独立した培養で３反復した．

３．分生子数計数

分生子が着生している菌糸領域を寒天培地ごと直径5 mmの円形に抜き取り，分生子懸濁液１ml中でボルテックスにて30分撹拌し，血球計算板にて計数した．これらの実験は独立した培養で３反復した．

４．有意差検定

データの有意差検定はエクセル2007にてF-検定及びt-検定により行った．危険率は0.05とした．

実験結果及び考察

１．分生子形成における光応答の確認

A. oryzae RIB40株の白色蛍光灯光に対する応答を確認するため，CD寒天及びPDAによる寒天平板培養を行った．それぞれ，２枚のプレート培地中央に約106個の分生子を含むRIB40分生子液を滴下し，１枚をアルミ箔で覆い，１枚は透明ビニール袋に入れて白色光下に置き，30℃にて３日間培養した（図１A）．まず，コロニー外観であるが，CD培地暗培養ではコロニー中央部に分生子を少量形成したが，CD培地明培養では，目視ではほとんど分生子形成を確認できず，白いコロニーを形成した（図１A上段）．一方PDA暗培養ではコロニー中央部に緑色の分生子を形成したが，PDA明培養ではコロニー中央部に暗黄色の分生子を形成した（図１A下段）．なお,この明暗培養条件の違いによる分生子の色の違いであるが，図１の写真撮影後，数日間室温で培養を継続して観察したところ（光環境は昼夜に従い変化）周囲に緑色の分生子が形成された後も，連続光照射下で形成された分生子の部分の色は暗黄色のままであったこと，血球計算板にて分生子数を計数する際に光照射培養の分生子の中に時折通常より大きな分生子が観察されたこと等から，明暗の違いにより，分生子になんらかの質的な違いが生じたと考えられる．また，３日培養時のコロニー径はそれぞれ，CD暗培養27 mm，CD明培養24 mm，PDA暗培養45 mm，PDA明培養38 mm，であった（図１B）．単位面積当たり形成分生子数を計数したところ図１Cのように，同一の培地における明暗条件の比較ではどちらの培地においてもそれぞれ，暗培養で明条件よりも顕著に多量の分生子を形成していた．従って，我々の研究室の実験条件では，麹菌RIB40株は暗培養にて多量に分生子をつけ，明培養では分生子形成が阻害されることが確認された．また，明培養では菌糸生育も有意に阻害されることが明らかとなった．この結果はHatakeyama等の*A. oryzae*の報告の一部と矛盾が無いと言える．

２．乾燥，通気の分生子形成への影響

Hatakeyama等の報告では，*A. oryzae*の分生子形成における湿度や酸素の影響については調べられていない．*A. nidulans*では光以外にも乾燥や通気が分生子形成に大きな影響を与えることが経験的に知られている．すなわち，寒天培地を薄く作成し，よく乾燥させてから植菌すると分生子を多く付けるが,培地を厚くし，乾燥が不十分だと有性生殖が優勢する．また，通気が良好の場合は分生子を多く付けるが，プレートをビニールテープにてシールして通気を遮ると有性生殖が優勢する．このような結果は*A. nidulans*においては再現性が良いことが解っている．そこで，*A. nidulans*で如実に分生子形成と有性生殖の割合に違いが見られる上記条件と同様の条件で，厚めのPDAに*A. oryzae*RIB40を植菌した物及び，薄く乾燥したPDAに植菌し，さらにシリカゲルをプレートの周囲に敷き詰めた物を用意しそれぞれアルミ箔で包み，高湿度培養のプレートは湿度100%に設定した恒温恒湿槽に，乾燥培養プレートは通常の培養室に静置し，30℃３日間培養したところ，*A. nidulans*とは逆に高湿度培養の方で分生子形成が促進されたように見えた（図２A上段）．しかし，分生子形成率でみると，反復実験したプレート間のバラつきが大きくどちらの条件において分生子形成が促進されているかは判別できなかった（図２B）．しかしながら，少なくとも，*A. nidulans*において観察される乾燥条件による分生子形成促進効果は，*A. oryzae*ではみられなかった．また，プレート周囲をビニールテープでシールしたもの（非通気条件）としないもの（通気条件）をそれぞれアルミ箔につつんで30℃３日間培養したところ，どちらも同程度に分生子を形成した（図２A下段および図２B）．
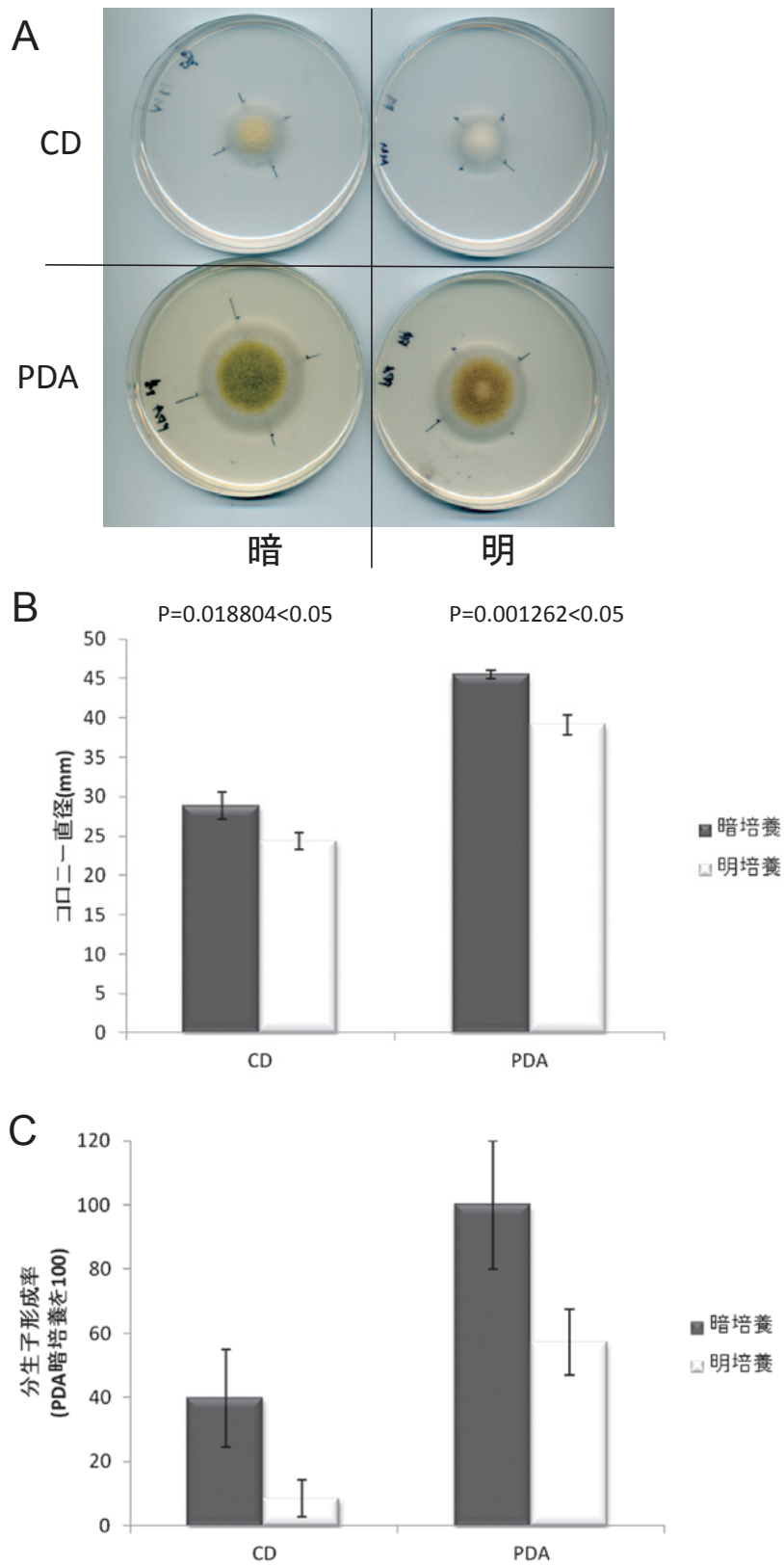
図１．明培養では分生子形成と菌糸成長の双方が阻害される

A，平板培養写真．上段，CD，下段，PDA．それぞれ左側暗培養，右側明培養．B，菌糸成長．C，単位面積当たり分生子数，PDA暗培養を100％とした相対数で分生子形成率を表示
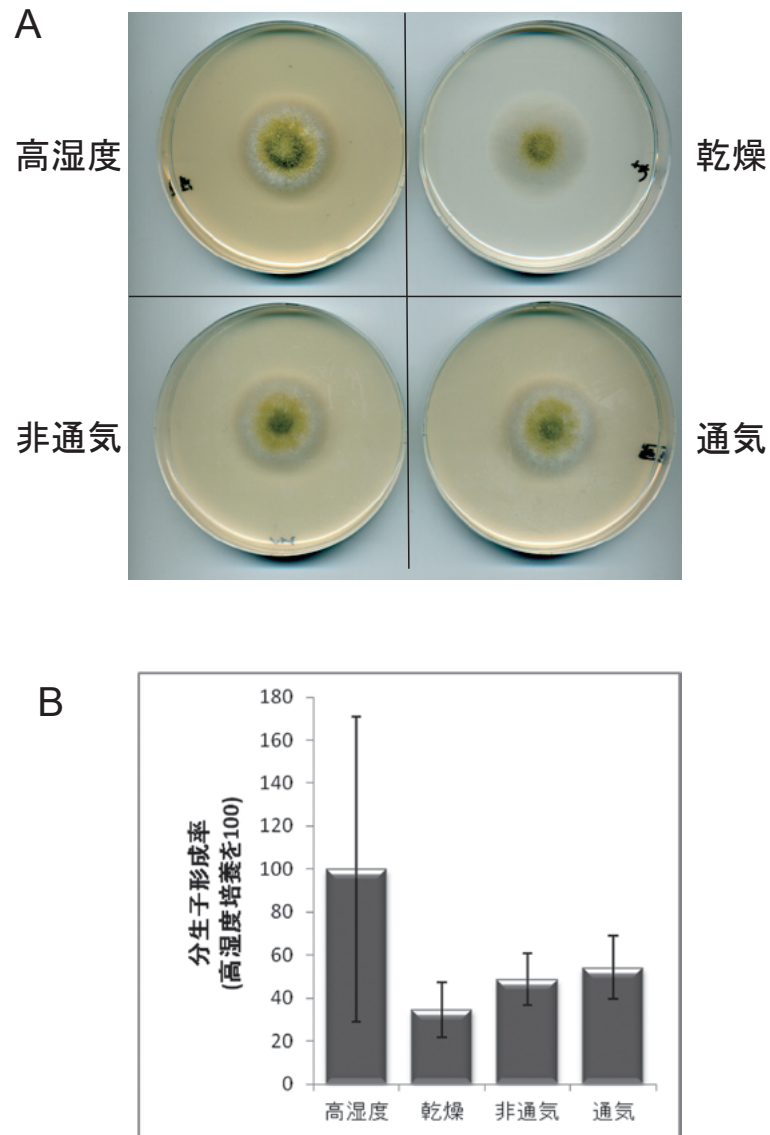
図２．平板培養における湿度および通風の影響

A，上段左高湿度培養．上段右乾燥培養．下段左非通気培養．下段右通気培養．B，単位面積当たり分生子数，高湿度培養を100％とした相対数で分生子形成率を表示

これらの結果から，３日間培養において，光は *A. oryzae* RIB40の分生子形成を阻害する主要な要因であり，暗培養では高湿度あるいは非通気条件が分生子形成に明確な阻害効果を示さないことが明らかになった．これは，*A. nidulans* を始めとする他の *Aspergillus* 属菌とはかなり違った制御様式になっており，今後その分子機構の解明が待たれる．一方，Hatakeyama *et al.*[2)] によれば，PDA上にスポット植菌した *A. oryzae* RIB40を連続白色光下において５日間培養したコロニーは，分生子をほとんど形成せず白いコロニーを形成したのに対し，我々の実験において４日間培養コロニーは，明暗ともほぼ同様の分生子形成を示す外観をしており，また，参考値ながら２反復の培養実験における分生子形成率は，暗培養１に対して明培養0.88と，ほとんど差が見られなかった．そのため，我々の実験では，３日間培養での分生子形成率の差

は，光により菌糸生長および細胞分化が全般的に遅延した結果とも解釈できる．Hatakeyama *et al.* によれば，赤色光は分生子形成を阻害し，青色光は分生子発芽時および菌糸生長時に致死的な影響を *A. oryzae* RIB40に与えるとしている．現有の我々の設備では光の波長を分けた実験が出来ないが，上記の菌糸生長の阻害結果より考察すると，我々の白色光を用いた実験においては白色光に含まれる赤色光の効果よりも青色光の効果が大きく影響しているのかもしれない．このような違いを生じた原因として可能性が高いのは光源の強度である．我々の実験条件では卓上蛍光灯による白色光の平板培地表面付近の光量子束密度は約30 μmol m^{-2} s^{-1} であったが，一方，Hatakeyama *et al.* の人工気象器では白色光94.2 μmol m^{-2} s^{-1}，赤色光75.5 μmol m^{-2} s^{-1}，青色光97.7 μmol m^{-2} s^{-1}とかなり強力であった．

今後は，光強度と波長を自在に設定できる光源を用いた実験で，*A. oryzae* RIB40の光応答機構を詳細に調べていきたい．

謝　辞

本研究は農研機構長期在外研究員派遣制度の一部として行われた．

要　旨

麹菌 *Aspergillus oryzae* は我が国伝統醸造産業のみならず酵素産業にも重要な産業微生物である．我々は *A. oryzae* の分生子形成における光応答を検討し，*A. oryzae* が暗培養で多数の分生子を形成し，光は分生子形成を阻害することが明らかとなった．

参考文献

1）楠本憲一，古川育代，鈴木聡，柏木豊，麹菌の簡便かつ効率的な胞子形成能の強化法，食総研報. **71**, 39-43（2007）.

2）Hatakeyama, R., *et al.*, Light represses conidiation in koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **71**: 1844-9.（2007）.

3）Calvo, A. M., *et.al.*, Sporogenic Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on Development of *Aspergillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 3668–3673,（1999）.

4）Rodriguez-Romero, J., *et al.*, Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol*. **64**, 585-610（2010）.

5）Linden H. Circadian rhythms. A white collar protein senses blue light. *Science*. **297**（5582）: 777-8（2002）.

6）Purschwitz, J., *et al.*, Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*. **18**, 255-259（2008）.

7）Bayram, O., *et al.*, VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*. **320**, 1504-1506（2008）.

8）Bayram, O. and Braus, G. H., Coordination of secondarymetabolismand development infungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*. **36**, 1–24（2012）.

9）Bayram, O., *et al.*, More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell*. **19**, 3254-3262（2008）.

技術報告

精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の2007年度技能試験結果

内藤　成弘，進藤　久美子，安井　明美

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所
〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12

Results of the proficiency testing program for determination of cadmium and essential inorganic elements in milled rice flour in 2007

Shigehiro Naito, Kumiko Shindoh, Akemi Yasui

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

National Food Research Institute, NARO provided a proficiency testing program for determination of cadmium and essential inorganic elements in milled rice flour in 2007. Reported values from 47 laboratories were analyzed according to the International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. Each analyte, that is, water, cadmium or 9 essential inorganic elements had at least one reported value with | z score | > 2. Assigned values of sodium, calcium and phosphorus could not be determined according to the Harmonized Protocol because of large variability between reported values. For these three analytes, informative values were determined from median values of reported values after removing outliers or mean values of 20 samples analyzed in a homogeneity test. Among the 18 laboratories which submitted at least a value with | z score | > 3, 10 laboratories reported more than one value with | z score | > 3.

Keywords: 技能試験，精米粉末，カドミウム，必須無機元素，水分

緒　言

技能試験[1)2)]への参加は，試験所認定[3)4)]や食品衛生法上の検査機関登録の必須条件[5)]であり，農林水産省から実態調査等の分析を受託する分析機関も技能試験への参加が要求されている[6)]．これは，コーデックス委員会（Codex Alimentarius Commission）が，食品の輸出入に係わる試験所の条件の一つとして，適切なプロフィシエンシィテスティング（技能試験）への参加を挙げており[7)]，第三者が実施する技能試験に参加することが分析値の信頼性確保の一つの方法として国際的に認識されているためである．

技能試験データベースEPTIS（European Proficiency

Testing Information System）によると，食品・飲料の分析化学の技能試験は，26カ国の海外プロバイダーから414プログラム，食品・飲料の微生物検査の技能試験は，15カ国の海外プロバイダーから125プログラムが提供されている[8]．しかし，海外プロバイダーが提供する技能試験では，防疫上の理由から試料の日本への輸入が許可されず国内の試験室が参加できない場合や，国内で関心の高い試料・成分のプログラムが定期的に提供されていない場合がある．一方，国内で提供されている食品分析の技能試験[9)〜14)]は，対象食品・成分に限りがある．そこで，（独）農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所では，食品からの摂取量低減のための行政的施策が実施されているカドミウムについて，国内で関心の高い米をマトリックスに選択し，さらに成分表示等に関連して分析機会の多い必須無機元素も対象成分に加えて，技能試験の提供を2006年度から開始した[15]．

技能試験では，実施者が均質な試料を参加試験室に配付し，各試験室は任意の方法で分析後，実施者に分析値を提出する．実施者は分析値の評価結果（かたより）を示した報告書を各参加試験室に送付するので，参加試験室はかたよりの大小によって各自の技能を確認し，他の試験室の分析方法などを参考にして，技能試験の結果を技能向上に役立てることができる．技能試験の結果は参加者だけに報告されるのが原則のため，参加者以外が技能試験結果の情報を入手することは一般的には制限されている．しかし，測定値の分布や使用された測定法に関する情報など，技能試験結果には参加者以外にとっても有益な情報が多く含まれる．また，技能試験への参加の必要性を啓蒙するためにも，技能試験結果を多くの人に知ってもらう必要がある．そこで，本報告では，2007年度に実施した精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の技能試験結果について報告する．

実験方法

1．試料

玄米を家庭用精米機（象印，BR − EA35）で歩留まり92％弱に精米し，チタン製0.5 mmメッシュ及びチタン製ロータをセットした超遠心粉砕機（14000 rpm, Retsch ZM200）で粉砕し，縮分器（Retsch PT100）で精米粉末試料約20 gをデジチューブ（ジーエルサイエンス，65 mL）に詰め，チューブにラベルを貼り，そのチューブをマジックカット付き規格袋（旭化成パックス，飛竜N-9）に入れ，食品用真空包装機（東静電気，TOSPACK V − 380G）でシーリングし，配付まで常温保管した．

2．均質性確認

128本の試料チューブからランダムに10本抜き取り，抜き取った各チューブから元素分析用の２試料及び水分測定用の２試料を約１gずつサンプリングした．カドミウム及び必須無機元素の前処理はマイクロ波分解装置（マイルストーン，ETHOS1600）を用いて硝酸-過酸化水素で分解し，測定には誘導結合プラズマ発光分析（ICP − AES）装置（Varian，Vista-Pro）を用いた．水分は，試料約１gをアルミ箔カップに分取し（n＝2），通風式加熱乾燥機（テーオー科学製作所）にて135 ℃，１時間乾燥させた際の試料重の減少量から求めた．

均質性の判定は，分析化学試験室の技能試験に関する国際ハーモナイズドプロトコル（以後，ハーモナイズドプロトコルと略す）[1]に従った．

3．測定対象成分

測定対象成分はカドミウムを必須とし，ナトリウム，カリウム，マグネシウム，カルシウム，リン，鉄，亜鉛，銅，及びマンガンは任意とした．また，元素測定時に併行して，試料量１gを用いて，135 ℃，１時間の常圧通風加熱乾燥法で水分測定を行うことを要求した．

4．配付

試料は2007年10月15日に48試験所へ発送した．試料番号がラベルされた試料チューブとともに実施要領，試験結果報告用紙，分析方法報告用紙を参加者に送付した．報告の締め切りは2007年12月14日とした．

5．統計解析

統計解析の手順は，ハーモナイズドプロトコル[1]に従った．ただし，外れ値検出には，ハーモナイズドプロトコルに例として記載されている中央値±50％超の値を外れ値とする方法以外に箱ひげ図[16]も用いた．zスコアを計算するときの標準偏差は，付与値又は参考値をHorwitzの式[17)18)]に代入して計算した．付与値を求めるための計算から除外した試験室についても，参考値としてzスコアを計算した．解析にはExcel2002及びフリーウエアのR2.6（http://www.r-project.org/）を用いた．

技能試験の結果

1．配付試料の均質性

ハーモナイズドプロトコル[1)]に従って均質性確認試験を行った結果，水分及び10元素は均質であった．ハーモナイズドプロトコル[1)]では，均質性確認試験に用いる分析法の併行標準偏差s_{an}は，試験目的に適合した標準偏差σ_pの1/2以下を推奨している．食品分析分野でHorwitzの式が適用可能な化学分析法については，σ_pにHorwitzの式を用いて計算した室間再現標準偏差の予測値を用いる．この試験の均質性確認試験における併行標準偏差は，すべての成分でσ_pの1/2以下であった．新鮮重当たりの測定値を水分値で補正した乾物重当たりの測定値を用いて計算した不確かさには，新鮮重当たりの測定値と水分値の両方の不確かさが影響するが，乾物重当たりの測定値の合成相対標準不確かさ（表１）は，新鮮重当たりの測定値の合成相対標準不確かさ（表１では省略）の-0.1％（銅のみ）～0％（銅以外の９元素）であった．水分の参考値6.3％の精米粉末試料を配付した2006年度技能試験[15)]の均質性確認試験結果でも，10元素の乾物重当たりの測定値の合成相対標準不確かさは，新鮮重当たりの測定値の合成相対標準不確かさの-0.3％～+0.2 ％であり，低水分の試料では，併行条件下で20点（10試料×２反復）測定した水分値の不確かさが乾物重当たりの測定値の不確かさに与える影響は小さかった．

2．報告数と参加機関

締め切り日までの44試験室と締め切り後の３試験室の合計47試験室から報告用紙が返送された．47試験室の所属先による分類を表２に示す．

3．報告値の解析結果

回収率の測定は行っておらず，元素の報告値は回収率によって補正していない．各参加試験室から報告された水分及び各元素の新鮮重当たりの測定値（mg/kg fw）の分布を図１に示す．ハーモナイズドプロトコル[1)]に従って報告値から求めた付与値及び標準不確かさ，zスコアの分布を表３に示す．表３には，報告された水分で補正した乾物重当たりの測定値（mg/kg dw）の解析結果も示す．ナトリウム，カルシウム及びリンの報告値は，新鮮重当たり及び乾物重当たりの両方ともにばらつきが大きく，ハーモナイズドプロトコル[1)]に従った付与値（Huberのロバスト平均

表２．参加者の所属先による分類

参加機関	参加人数
独法研究機関	16
都道府県の研究機関	14
依頼分析機関	14
民間会社	2
大学	1
計	47

表１．配付試料の均質性確認試験の結果

測定対象成分	平均値	s_r [a)]	s_{bb} [b)]	u_{bb} [c)]	均質性由来の標準不確かさ[d)]	合成標準不確かさ[e)]	合成相対標準不確かさ（%）
水分（%（mass/mass））	13.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.7
Cd （mg/kg dw）	0.430	0.008	0.003	0.004	0.004	0.009	2.1
Na （mg/kg dw）	7.47	0.18	0.08	0.09	0.09	0.20	2.7
K （mg/kg dw）	1253	26	3	12	12	29	2.3
Mg （mg/kg dw）	397	4	8	2	8	9	2.3
Ca （mg/kg dw）	65.8	1.4	0.8	0.6	0.8	1.6	2.4
P （mg/kg dw）	1357	34	11	16	16	38	2.8
Fe （mg/kg dw）	2.53	0.16	0	0.08	0.08	0.18	7.0
Zn （mg/kg dw）	23.0	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	1.8
Cu （mg/kg dw）	3.33	0.05	0.02	0.02	0.02	0.06	1.7
Mn （mg/kg dw）	13.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	1.9

a）併行標準偏差
b）試料チューブ間の均質性標準偏差
c）JIS Q 0035: 2008に記載された併行精度の不十分さを考慮した試料チューブ間の均質性標準偏差の最大推定値
d）JIS Q 0035: 2008に従いb）とc）の大きい方を採用
e）a）とd）を合成した標準不確かさ
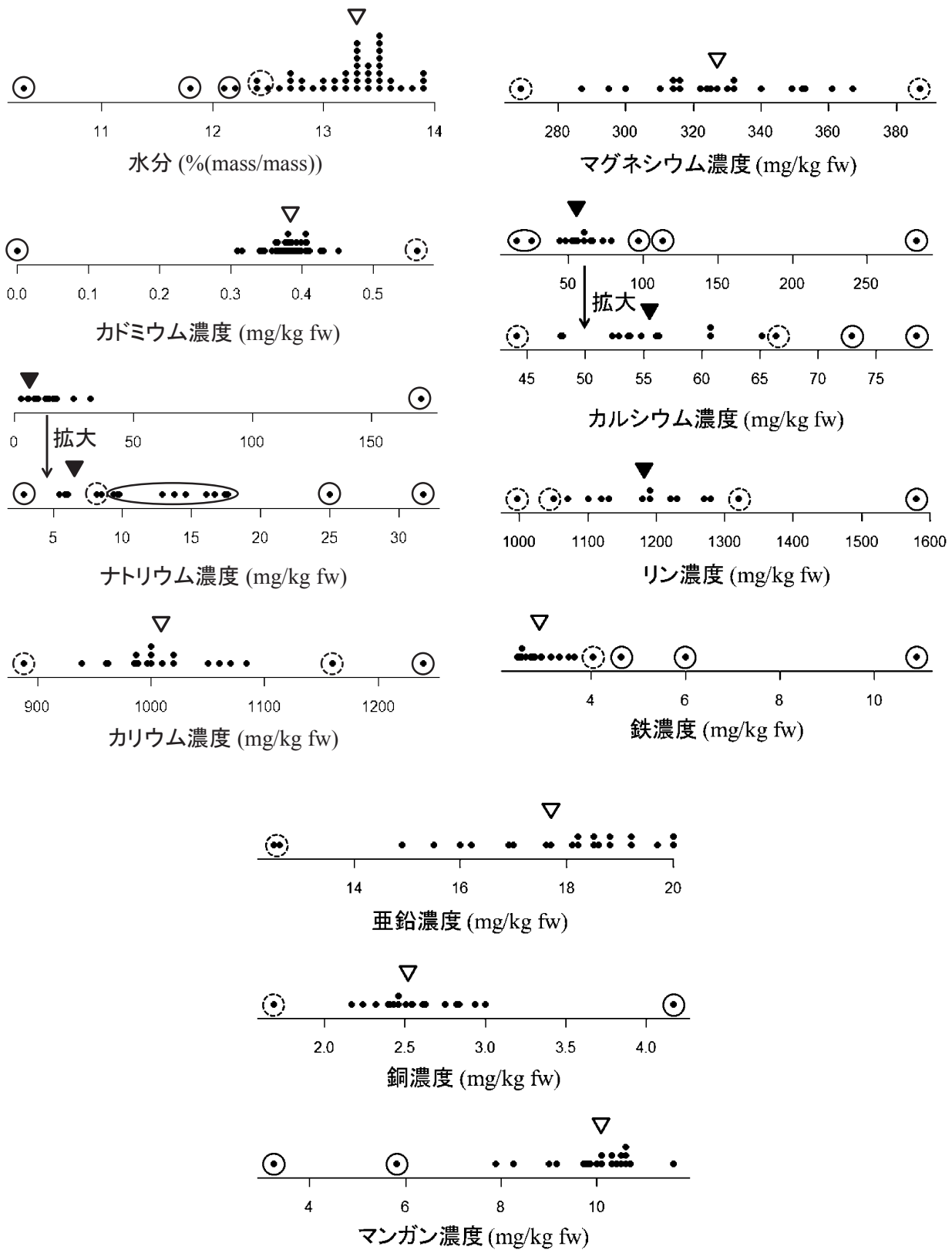
図１．報告値のドットプロット

一つのドットは一つの報告値を示す．
○：｜zスコア｜>３の報告値，◌：２<｜zスコア｜≦３の報告値，▼：付与値，▽：参考値

値，又は報告値の分布を正規分布カーネルで推定したカーネル密度のモード）を決定できなかった．そこで，これら３元素については，外れ値除去後のデータの中央値と均質性確認試験データの平均値を比較し，ナトリウム｛8.93 mg/kg fw（10.0 mg/kg dw）と6.49 mg/kg fw（7.47 mg/kg dw)｝は後者，カルシウム｛55.5 mg/kg fw（63.1 mg/kg dw）と57.1 mg/kg fw（65.8 mg/kg dw)｝及びリン｛1185 mg/kg fw（1365 mg/kg dw）と1182 mg/kg fw（1357 mg/kg dw)｝は前者を付与値の参考値に採用した．前者と後者が近い値の場合（カルシウム及びリン），前者はカーネル密度のモードの採用可否を判断するときの目安値のため，参考値とした．前者が後者よりも30 %以上大きかったナトリウムでは，前者にコンタミネーション（汚染）の影響が考えられたため，後者を参考値に採用した．参考値については，その標準不確かさは計算しなかった．

表３の各元素の１回測定の相対標準不確かさは，複数の試験室で複数の分析法を用いたときの不確かさを示しており，同じ分析法を用いる室間再現標準偏差よりも大きくなる変動要因を含んでいる．表１の各元素の合成相対標準不確かさは，単一試験室で１種類の分析法を用いて1回分析したときの不確かさを示す．各元素の相対標準不確かさは，表３の値の方が表１の値よりも２～６倍も大きかった．しかし，室間再現相対標準偏差の大きさの評価指標であるHorRat（R）[19]を表３の１回測定の相対標準不確かさについて計算すると0.3～1.6であり，Horwitzの式で予想される室間再現標準偏差と同程度（0.3～1.6培）の大きさであった．水分は測定法を統一したため，表３の水分の相対標準不確かさ2.9 %が表１の水分の相対標準不確かさ0.7 %よりも大きくなる変動要因は，試験室間変動だけである．

表３．技能試験結果

測定対象成分	有効データ数[b]	付与値[c]	付与値の標準不確かさ[d]	１回測定の標準不確かさ[e]	１回測定の相対標準不確かさ[e]	HorRat（R）	全スコア数	｜zスコア｜≦2の試験室数	｜zスコア｜≦2の率（%）
水分（%（mass/mass））	46	13.3	0.1	0.38	2.9	1.1	47	40	85
Cd　(mg/kg fw)	46	0.384	0.003	0.022	5.7	0.3	47	45	96
Na　(mg/kg fw)[a]	(12)	(6.49)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(20)	(4)	(20)
K　(mg/kg fw)	22	1010	10	54	5.3	0.9	22	19	86
Mg　(mg/kg fw)	23	327	6	27	8.3	1.2	23	21	91
Ca　(mg/kg fw)[a]	(16)	(55.5)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(21)	(12)	(57)
P　(mg/kg fw)[a]	(14)	(1190)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(15)	(12)	(80)
Fe　(mg/kg fw)	17	2.90	0.11	0.45	15.5	1.1	20	16	80
Zn　(mg/kg fw)	22	17.7	0.4	1.9	10.7	1.0	23	21	91
Cu　(mg/kg f w)	19	2.52	0.06	0.24	9.5	0.7	21	19	90
Mn　(mg/kg f w)	21	10.1	0.1	0.68	6.7	0.6	23	21	91
Cd　(mg/kg dw)	46	0.442	0.004	0.027	6.1	0.3	47	45	96
Na　(mg/kg dw)[a]	(12)	(7.47)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(20)	(4)	(20)
K　(mg/kg dw)	22	1160	10	56	4.8	0.9	22	20	91
Mg　(mg/kg dw)	23	372	8	39	10.5	1.6	23	20	87
Ca　(mg/kg dw)[a]	(16)	(63.1)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(21)	(11)	(52)
P　(mg/kg dw)[a]	(14)	(1370)	計算不可	計算不可	計算不可	計算不可	(15)	(12)	(80)
Fe　(mg/kg dw)	17	3.32	0.12	0.50	15.1	1.1	20	16	80
Zn　(mg/kg dw)	22	20.4	0.4	2.1	10.3	1.0	23	21	91
Cu　(mg/kg dw)	19	2.89	0.06	0.28	9.7	0.7	21	19	90
Mn　(mg/kg dw)	21	11.5	0.2	0.82	7.1	0.6	23	21	91

a）ハーモナイズドプロトコル[1)]に従って付与値を決定できなかったため解析結果はすべて参考値

b）付与値を決定したデータ数

c）水分，Mg（mg/kg dw）はカーネル密度のモード，それ以外の測定対象成分はHuberのロバスト平均値（H15）を付与値に採用．Na（mg/kg fw, mg/kg dw）は均質性確認データの平均値，Ca（mg/kg fw，mg/kg dw）及びP（mg/kg fw，mg/kg dw）は有効データの中央値を参考値に採用．

d）水分，Mg（mg/kg dw）はカーネル密度のモードの標準偏差（ブートストラップ法で200回反復計算），それ以外の測定対象成分はHuberのロバスト標準偏差（H15）/$\sqrt{有効データ数}$

e）水分，Mg（mg/kg dw）はカーネル密度のモードの標準偏差×$\sqrt{有効データ数}$，それ以外の測定対象成分はHuberのロバスト標準偏差（H15）

考　察

1．報告値の分布

水分及びすべての測定対象元素について，「疑わしい」と判定される２＜｜zスコア｜≦３の報告値又は「不満足」と判定される｜zスコア｜＞３の報告値が存在し，マグネシウム及び亜鉛以外の測定対象元素及び水分では｜zスコア｜＞3の報告値が存在した（図１）．2006年度技能試験結果[15]でもすべての測定対象元素について，｜zスコア｜＞２の報告値が存在し，カドミウム以外の測定対象元素では｜zスコア｜＞３の報告値も存在した．報告値のばらつきが大きい測定対象元素は，2006年度，2007年度ともにナトリウム，カルシウム，鉄であった．これら３元素は，付与値又は参考値よりもプラス方向の外れ値が多いので，原因の一つとしてコンタミネーションが考えられる．ナトリウムは食品分析の専門書[20]でもコンタミネーションについて注記されている元素である．これら２回の技能試験の結果は，水分や必須無機元素のような基本的な食品成分の分析においてもかたよりの大きい報告値が存在するため，分析値のかたよりを点検する必要性を示している．

2．｜zスコア｜＞３の報告値に関する検討

｜zスコア｜＞３の報告値を与えた分析における試料量，前処理法，測定法を表４に示す．水分は測定条件（135℃，１時間，試料量１g，常圧通風加熱乾燥法）を統一したが，４試験室が｜zスコア｜＞3であり，４試験室とも低めに外れていた．低めに外れた原因は不明である．水分測定は元素分析と併行して行うことを参加者に要求したが，水分測定と元素分析を試料チューブ開封直後に行ったかは不明である．開封後の試料の保管状態によって配付試料の水分が変化して水分の報告値が外れ値となった場合でも，水分測定と元素分析を併行して行っていれば，その報告値は測定時の水分を正しく示し，その水分量に基づいて算出した乾物重当たりの元素濃度は，｜zスコア｜≦２になって「満足」と判定される可能性がある．｜zスコア｜＞3の水分を報告した４試験室は，新鮮重当たりの元素濃度で合計３個の｜zスコア｜＞３の値を報告（表５）したが，それら３個の値は乾物重当たりの元素濃度でも｜zスコア｜＞3であった．

マグネシウムと亜鉛以外の８元素で｜zスコア｜＞3の報告値は合計30個存在し，プラスのかたよりが24個，マイナスのかたよりが６個であった．中でもナトリウムではかたよりの大きい報告値が多く，全報告値20個のうち｜zスコア｜≦２の値は４個のみであった．このナトリウムを除いた７元素でも｜zスコア｜＞３の報告値が16個存在し，プラスのかたよりが11個，マイナスのかたよりが５個で，ナトリウム以外でもプラス側にずれた報告値が多い傾向が認められた．｜zスコア｜＞３の報告値を与えた元素分析における前処理法及び測定法について調べたところ，同一又は類似条件の前処理法及び測定法で|zスコア|≦2の報告値があり，特定の方法に問題は認められなかった．

水分及び10元素について，｜zスコア｜＞３の報告値（合計34個）を提出した18試験室の報告値のzスコアを表５に示す．18試験室中10試験室が｜zスコア｜＞3の報告値を２個以上提出していた．また，元素分析において，｜zスコア｜＞３の報告値を２個以上提出していた９試験室中４試験室では｜zスコア｜＞３の報告値（試験室No. 21は２個，試験室No. 22は２個，試験室No. 24は２個，試験室No. 33は４個）はすべてプラス側のかたよりであったが，報告値と付与値又は参考値との比率（試験室No. 21はナトリウム：26.3倍及びカルシウム：2.0倍，試験室No. 22はナトリウム：1.5倍及び銅：1.7倍，試験室No. 24はナトリウム：4.9倍及びカルシウム：1.3倍，試験室No. 33はナトリウム：2.2倍，カルシウム：1.4倍，リン：1.3倍及び鉄：1.6倍）は一定ではなく，残り５試験室ではプラス側のかたよりとマイナス側のかたよりが混在しており，かたよりの原因は元素ごとに異なることが推察された．分析値がずれる原因としては，コンタミネーション，計算ミス，希釈倍率の間違い，検量線作成の問題，前処理条件の問題，測定条件の問題等が考えられるが，参加者から報告された試料量，前処理法，測定法の情報から原因を明らかにすることはできなかった．｜zスコア｜＞３の報告値を提出した試験室の内部質管理（IQC: Internal Quality Control）の実施状況は未確認であるが，内部質管理を適切に実施すれば分析値のかたよりは点検できるため，技能試験に参加するとともに内部質管理の重要性を再認識する技能試験結果であった．

要　約

（独）農研機構食品総合研究所が実施した精米粉末中のカドミウム及び必須無機元素の2007年度技能試験の47参加試験室からの報告値を技能試験の国際ハーモ

ナイズドプロトコルに従って解析した．水分，カドミウム及び９必須無機元素のすべての測定対象成分について｜zスコア｜＞2の報告値が存在した．ナトリウム，カルシウム，リンは，報告値のばらつきが大きく，ハーモナイズドプロトコルに従っての付与値の決定はできず，これら３成分については，外れ値除去後の中央値又は均質性確認試験の20試料の分析値の平均値から参考値を決定した．｜zスコア｜＞3の報告値を提出した18試験室のうち，10試験室は｜zスコア｜＞3の報告値を複数の測定対象成分で提出していた．

謝　辞

本報告の技能試験は，農林水産省の「安全で信頼性，機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発プロジェクト」の予算で実施した．均質性確

表４．｜zスコア｜＞3の報告値の分析条件

測定対象成分	付与値（）内は参考値	試験室 No.	報告値	zスコア	試料量（g）	前処理法	測定法
水分（%(mass/mass)）	13.3	5	10.3	-8.3	1	―――	135 ℃，1時間の常圧通風加熱乾燥法による重量減少分（2点併行の平均値）
		21	11.8	-4.2			
		36	12.19	-3.1			
		40	12.1	-3.3			
Cd（mg/kg fw）	0.384	37	0	-5.4	1	乾式灰化（550℃，８時間）	フレーム原子吸光法（228.8 nm）
Na（mg/kg fw）	（6.49）	5	9.37	3.7	0.5	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（588.995 nm）
		9	9.77	4.2	0.9845 1.0113	湿式分解 （硝酸－過塩素酸－ふっ化水素酸）	ICP発光法（588.995 nm）
		21	171	211	5.0564	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
		22	9.63	4.0	1	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（589.592 nm）
		24	31.8	32	1.0559	乾式灰化（500℃，３時間を２サイクル）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
		26	16.7	13	1.35	乾式灰化（(575℃，３時間）	炎光法（589.0 nm）
		27	17.6	14	2.1018	乾式灰化（575℃，５時間）	炎光法（589.0 nm）
		29	2.88	-4.6	1	希酸抽出（１％塩酸）	フレーム原子吸光法（589.6 nm）
		33	14.6	10	5.000	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	炎光法（589.0 nm）
		35	12.9	8.2	2	希酸抽出（１％塩酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
		37	25	24	1	希酸抽出（１％塩酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
		39	13.8	9.4	2.0613	希酸抽出（１％塩酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
		42	17.4	14	3.0	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm，塩化ストロンチウム添加）
		43	16.1	12	1	希酸抽出（１％塩酸）	フレーム原子吸光法（589.0 nm）
K（mg/kg fw）	1010	45	1240	4.0	0.3	マイクロ波湿式分解（硝酸）	炎光法（766.5 nm）
Ca（mg/kg fw）	（55.5）	14	283	46	3	乾式灰化（420℃，８時間）	フレーム原子吸光法（422.7 nm）
		21	113	12	5.0564	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（317.9 nm）
		24	72.9	3.6	1.0559	乾式灰化（500℃，３時間を２サイクル）	フレーム原子吸光法（422.7 nm）
		33	78.5	4.7	5.000	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（317.9 nm）
		37	97	8.5	1	乾式灰化（550 ℃，8時間）	フレーム原子吸光法（422.7 nm，塩化ランタン添加）
		42	15.7	-8.1	3.0	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	フレーム原子吸光法（422.7 nm，塩化ストロンチウム添加）
		45	25.5	-6.1	0.3	マイクロ波湿式分解（硝酸）	フレーム原子吸光法（422.7 nm）
P（mg/kg fw）	（1190）	33	1580	5.9	5.000	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（177.4 nm）
Fe（mg/kg fw）	2.90	33	4.65	4.4	5.000	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（259.8 nm）
		37	6	7.8	1	乾式灰化（550℃，８時間）	フレーム原子吸光法（248.3 nm）
		45	10.9	20	0.3	マイクロ波湿式分解（硝酸）	ICP発光法（259.9 mm）
Cu（mg/kg fw）	2.52	22	4.17	4.7	1	湿式分解（硝酸－過塩素酸）	ICP発光法（327.396 nm）
Mn（mg/kg fw）	10.1	14	3.26	-6.2	3	乾式灰化（420℃，８時間）	フレーム原子吸光法（279.5 nm）
		35	5.82	-3.9	5	乾式灰化（550℃，12時間）	フレーム原子吸光法（279.5 nm）

表５．｜zスコア｜＞３の報告値を提出した試験室の報告傾向

試験室No.	水分のzスコア	分析した元素数	分析した元素のzスコア		
			｜zスコア｜<＝2の率	2<｜zスコア｜<＝3	3<｜zスコア｜
5	-8.3	10	8/10	Zn: -2.8	Na: 3.7
9	0.6	10	8/10	Zn: -2.9	Na: 4.2
14	1.6	9（Cu以外）	5/9	Na: 2.1, P: -2.9	Ca: 46, Mn: -6.2
21	-4.2	9（P以外）	5/9	Cd: 2.5, Mg: -2.6	Na: 211, Ca: 12
22	-0.3	10	8/10		Na: 4.0, Cu: 4.7
24	-1.7	10	6/10	P: -2.1, Cu: -2.4	Na: 32, Ca: 3.6
26	-0.6	10	8/10	Ca: 2.2	Na: 13
27	0.3	10	9/10		Na: 14
29	0.6	5（Cd, Na, K, Mg, Ca）	4/5		Na: -4.6
33	-0.8	10	5/10	K: 2.6	Na: 10, Ca: 4.7, P: 5.9, Fe: 4.4
35	-0.3	10	7/10	Ca: -2.3	Na: 8.2, Mn: -3.9
36	-3.1	1（Cdのみ）	1/1		
37	-0.1	9（P以外）	5/9		Cd: -5.4, Na: 24, Ca: 8.5, Fe: 7.8
39	-2.2	10	9/10		Na: 9.4
40	-3.3	10	9/10	Na: 2.6	
42	0.0	8（P, Fe以外）	6/8		Na: 14, Ca: -8.1
43	-2.5	10	9/10		Na: 12
45	0.8	8（Na, P以外）	5/8		K: 4.0, Ca: -6.1, Fe: 20

認試験の前処理を行っていただいた農研機構食品総合研究所分析ユニットの中澤法子氏に感謝いたします.

参考文献

1）Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories（IUPAC technical report）. Pure & Appl. Chem., **78**(1), 145-196（2006）.
http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf（引用日2012年10月30日）

2）JIS Q 17043，適合性評価 --- 技能試験に対する一般要求事項（2011）.

3）ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories（2005）.

4）JIS Q 17025, 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項（2005）.

5）厚生労働省，食品衛生検査施設における検査等の業務の管理の実施について（平成９年４月１日衛食第117号）

6）農林水産省，サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン－「評価・公表」に関する部分－
http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/survei/pdf/guide_zenbun.pdf（引用日2012年10月30日）

7）Codex CAC/GL 27, Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food（1997）.
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/355/CXG_027e.pdf（引用日2012年10月30日）

8）EPTIS, http://www.eptis.bam.de/（引用日2012年10月30日）

9）日本分析化学会，日本分析化学会が行っている技能試験，http://www.jsac.or.jp/ginousiken/（引用日2012年10月30日）

10）食品薬品安全センター，外部精度管理，http://www.fdsc.or.jp/hatanoken/gaibuseidokanri.html（引用日2012年10月30日）

11）日本食品分析センター，2012年度技能試験サービスのご案内，http://www.jfrl.or.jp/seminar/files/ginou_annai2012.pdf（引用日2012年10月30日）

12）日本冷凍食品検査協会，2012年度　細菌検査技能評価試験のご案内，http://www.jffic.or.jp/news/2011/02-102012.html（引用日2012年10月30

日）
13）日水製薬，細菌検査精度管理サーベイ，http://cosmokai.com/survey/（引用日2012年10月30日）
14）産業技術総合研究所　計量標準総合センター，農業・食品産業技術総合研究機構　食品総合研究所，バリデーションと不確かさ評価のための技能試験－第５回：玄米中無機元素分析－，http://www.nmij.jp/public/event/2012/proficiencytest/main.html（引用日2012年11月19日）
15）進藤久美子，塚越芳樹，内藤成弘，稲垣和三，鎗田孝，成川知弘，千葉光一，安井明美，精米粉末中カドミウム及び主要無機質の技能試験，分析化学，**57**(6)，427-437（2008）.
16）渡部洋，鈴木規夫，山田文康，大塚雄作，箱形図，探索的データ解析入門，初版（朝倉書店，東京），pp.33-37（1985）.
17）Horwitz, W., Kamps, L. R. and Boyer, K. W., Quality assurance in the analysis foods for trace constituents, J. AOAC, **63**(6), 1344-1354（1980）.
18）内藤成弘，Horwitzの式，最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック，第１版，安井明美，五十君靜信，後藤哲久，丹野憲二，湯川剛一郎編（サイエンスフォーラム，東京），pp.76-78（2010）.
19）Codex, CAC/GL 72-2009, Guidelines on analytical terminology（2009）.
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/11357/cxg_072e.pdf（引用日2012年10月30日）
20）安井明美，ナトリウム，新・食品分析法，日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編，（光琳，東京），pp.156-162（1996）.

技術報告

力学特性が異なる食品咀嚼中の筋電図と筋音図の比較

神山　かおる§，高　智紅

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所食品機能研究領域食品物性ユニット
〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12

Electromyography and Mechanomyography during Oral Processing of Food with Different Texture

Kaoru Kohyama§ and Zhihong Gao

Food Physics Laboratory, Food Function Division, National Food Research Institute,
National Agriculture and Food Research Organization,
2-1-12 Kannondai Tsukuba Ibaraki 305-8642

Abstract

Electromyography (EMG) using surface electrodes and mechanomyography (MMG) that are non-invasive methods were applied during oral processing of various food items. EMG has been widely used for the study of food texture, wheareas MMG has not been applied. A wide range of food samples such as thin liquid, thick liquid, soft gel, and two hard gels were used because their methods of oral processing are different. Electromyogram of both masseter and suprahyoid muscles and mechanomyogram of the right masseter muscle were recorded while normal subjects freely ate 6 g of food samples. Masseter muscle activity was shown, and the MMG signal was observed at the beginning and ending of the masseter EMG burst for each chew. Both EMG and MMG could analyze mastication kinematics such as the number of chews, masticatory time, and chewing cycle. The EMG signal amplitude increased for harder food items that required a greater chewing force, but the MMG signal amplitude did not relate to the food texture. These results suggest that both methods are useful for studying mastication kinematics, but EMG is more suitable for the study of food texture.

Keywords: Texture evaluation, mastication, mechanomyography, electromyography, gel

§ 連絡先（Corresponding Author），kaoruk@affrc.go.jp

和文要旨

被験者の負担が少ない咀嚼計測法として汎用されている筋電位と応用例のない筋音を比較した．摂食様式が異なる，低粘性の液体，高粘性の液体，軟らかいゲル，歯で噛まれる２種類のゲルという力学的特性が広範囲な食品を用いて，筋電図と筋音図を同時測定し，試料の力学的特性が及ぼす影響について検討した．健康な成人被験者が食品６gを自然に摂食する時に，代表的な咀嚼筋である咬筋の筋電位と筋音，舌骨上筋群からの筋電位を同時に収録した．一回噛む毎に，閉口に伴う咬筋の筋電位と，開口に伴う舌骨上筋群の筋電位が交互に出現し，咬筋の収縮前後に筋音が発生した．どちらの方法でも咀嚼回数や咀嚼時間，咀嚼周期等の咀嚼運動情報が得られた．一方，強い咀嚼力が必要な硬い食品で筋電位振幅が増加したが，筋音振幅は咀嚼力には対応していなかった．以上のことから，咀嚼運動の分析には筋電図，筋音図とも使用できるが，食品テクスチャー研究には筋電図の方が優れていることが示唆された．

キーワード：テクスチャー評価，咀嚼，筋音図，筋電図，ゲル

緒　言

近年，食品テクスチャー研究に摂食中のヒトの挙動の直接計測が取り入れられるようになった[1−4]．古くから行われてきた力学機器測定や官能評価によるテクスチャー測定法を補完する情報が得られる．例えば，摂食中に大きく変化するテクスチャーの動的な分析，歯で噛む／舌と硬口蓋の間で押し潰す等の摂食様式の違い，摂食挙動の個人差を客観的に数値として表現することができる．

食品研究者が行う摂食中のヒト計測では，咀嚼筋の皮膚表面から記録した筋電位計測［Electromyography（EMG）］が最も広く用いられている[5,6]．筋電位を時間に対してプロットした筋電図は，表面電極を用いた場合多数の筋繊維の活動電位が重畳した波形となり，筋の電気的活動を反映する[5,7]．咀嚼筋のうち咬筋は皮膚表面に近い位置にある大きな筋肉で，測定に高度な技術は不要で，噛む力が増すと振幅が大きくなることが知られている[6]．装置も比較的安価である．基礎研究の場にとどまらず，近年では企業における食品開発でも取り入れられている[4]．

一方，筋音測定［Mechanomyography（MMG），Vivromyography（VMG），Acoustic myography（AMG），Soundmyography，Sonomyography（SMG），Phonomyography（PMG）等と呼ばれる］は，筋肉の収縮伸張に伴う微細な振動を記録するもので，筋の機械的活動を反映する信号が得られる[7]．近年ではMMGとその図としてのmechanomyogramが最も使われる用語だが，日本では直訳とは違う筋音という名称が一般的である[7]．筋音も，筋肉表面に音，振動，加速度を検出するいずれかのセンサを装着して計測され非侵襲的であること，筋音計は筋電位測定の装置よりさらに安価で小型であることから，もし食品テクスチャー分析に有効な情報が得られれば，広く応用できると期待される．

筋電位と筋音は同じ筋で同時測定することができ，手指[8]や大腿部[9]の筋について運動生理学研究がある．食品咀嚼に関しては，筋電位は多くの文献がある[1−6]のに対し，筋音の応用はみられない．関連分野としては，持続的に食いしばった時の咬筋活動[10]及び嚥下時の顎下筋の活動[11]について，筋電図と筋音図が報告されているのみである．

本研究では，摂食様式が異なる，低粘性の液体から固体状食品までのテクスチャーが広範囲な食品を用いて，代表的な咀嚼筋である咬筋の筋電位と筋音を同時測定し，試料による影響について検討した．

実験方法

1．食品試料

低粘性の液体である水（サントリーフーズ(株)，南アルプスの天然水），高粘性の液体として嚥下困難者用増粘剤で調製したゾル（キッセイ薬品工業(株)，スルーソフトリキッド15%w/w）[12]，舌と口蓋で潰して食べられる軟らかいゼリー（雪印メグミルク(株)，フルーティりんごゼリー）と歯で噛んで食べるプロセスチーズ（雪印メグミルク(株)，ベビーチーズ，以下チーズ）及び寒天をベースとしたゲル状食品（鈴木製菓(株)，マルキミックスゼリー，以下寒天ゲル）を用いた．測定は20℃の室内で行った．チーズはカットした後冷蔵庫に入れ，実験直前まで５℃に保った．そ

の他の試料はすべて20℃に１時間以上放置した．

２．力学的特性の測定

テクスチャー特性試験は，２バイト法のテクスチャー分析法で行った。すなわち，一軸引張圧縮試験機（RE-33005，山電(株)）で，試料表面の５mm上方から試験を開始し，第１バイトでは食品の高さの66.7％まで１mm/sの等速圧縮した後，直ちに同じ速度で逆向きにプランジャーを初期位置まで引き上げ，続いて第２バイトを実施した．荷重をプランジャー断面積で除して応力，貫入距離を試料の初期高さで除して歪を求め，得られた応力－移動距離曲線から，第１バイト時の最大応力である「硬さ」，第１バイトでプランジャーを引き上げる際の試料体積あたりの仕事量である「付着性」，第２バイトと第１バイトの圧縮時の仕事量の比「凝集性」を算出した[14]．

水，ゾル，ゼリーは，「えん下困難者用食品」の基準測定法[13]に従い，食品試料を直径40 mm，高さ15 mmのステンレス製シャーレに充填し，直径20 mmの樹脂製円柱状プランジャーを用いて行った．なお，「えん下困難者用食品」の基準による液体状食品の測定では，「凝集性」は流動しやすさを示し，凝集しやすさとは異なる意味をもつ．そこで，本文中では，「硬さ」，「付着性」，「凝集性」と，「」つきで示した[14]．

噛んで食べられる固体状食品（チーズと寒天ゲル）については，一片15 mmの立方体状に切り，直径3 mmの樹脂製円柱状プランジャーを用いて，同上の条件で２回圧縮し，「硬さ」，「付着性」，「凝集性」を求めた．

３．咀嚼計測

実験計画は，（独）農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所，人間を対象とする生物医学的研究に関する倫理委員会の承認を得て，実験方法・安全性について事前に説明し，同意を得たうえで実験を行った．健常有歯顎者９名（男性３名，女性６名，平均年齢41.1歳）を被験者とした．

被験者の左右の咬筋及び舌骨上筋群に表面電極（バイオパック製EL503）をそれぞれ２個貼り付け，アンプ（バイオパック製筋電アンプEMG100C）を用いて増幅（Gain 1000，収録周波数範囲10～500 Hz，50 Hzの交流ノイズを除去）し，筋電位を測定した。なお，基準電極は咀嚼時に動かない利き腕でない側の手首に装着した．同時に，筋音計（メディセンス製MPS110）を用いて，右咬筋の筋電位電極の間に加速度トランスデューサ（9×9×4 mm，約1.5 g）を両面テープで貼り，筋音図を得た（Fig. 1）．筋音は，ヘッドアンプで増幅（Gain 1，500 mV/G）後，Gain 5×1，周波数範囲１～250 Hzの条件で測定した．

被験者を装置に慣れさせ，実験者が電極類の装着位置を確認するために，本試験前に食いしばり，開口，チューインガム（ロッテ(株)，フリーゾーン）１粒の
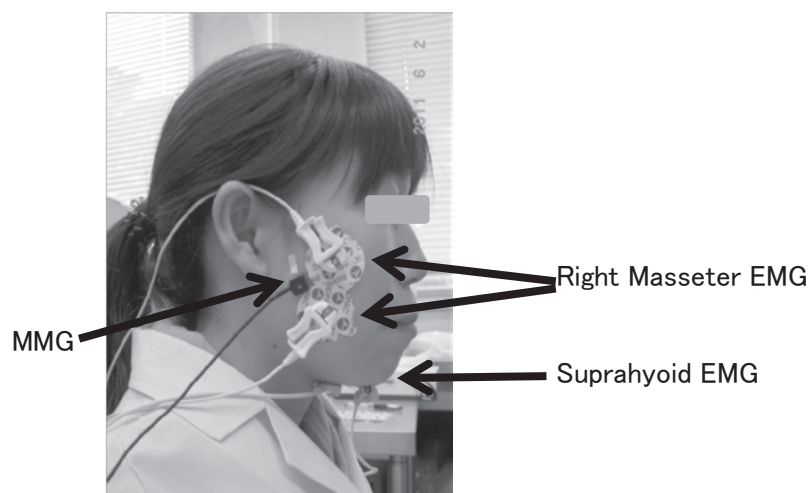
Fig. 1　Setting of EMG electrodes and an MMG sensor

The electrodes for EMG of the left masseter muscle are placed on the left side of the cheek.

咀嚼を行わせた．装着位置が適正であることを確認後，一口量として６gの試料をプラスチックスプーンに載せ，ランダムな順で被験者の口に入れ，自由に摂食，嚥下させた．被験者には，ボタンスイッチを渡し，嚥下をする毎に押すように指示した[15]．筋電位（３筋），筋音及び押ボタン信号は，５チャンネル分を同時にバイオパック製MP150システムにより，PCにサンプリングレート2000 Hzで収録し，付属の波形解析ソフトウエア（バイオパック製Acq*Knowledge* ver. 3.8.2）を用いて解析した．既報[15]のように，バースト状の筋電信号が出現する毎に，振幅，筋活動時間，筋活動量（バースト面積），周期を求め，活動１回毎の平均値を計算した．また，嚥下までの筋活動回数と，筋活動量総和を算出した．咀嚼側を決めずに自由に摂食しているため，咬筋筋電位のパラメータは左右の咬筋の平均値を用いた．咀嚼回数，咀嚼周期等，開口筋と閉口筋の筋電位と，閉口筋の筋音とで，ほぼ同等の情報が得られるパラメータは，もっともS/N比が大きかった咬筋筋電位から求めた．

４．統計解析

有意水準を $p < 0.05$ とし，統計処理ソフトSPSS 17.0J for Windowsを用いて，一元配置分散分析により試料差を解析した．有意差が認められた場合は，Tukeyの多重比較を行った．

結果及び考察

１．機器測定結果

Table 1 にテクスチャー機器測定結果を示す．歯を使わずに，直ちにあるいは舌と硬口蓋の間で押し潰された後に嚥下される食品試料（Fig. 2(a)）は，水＜ゾル＜ゼリーの順で応力が高く，「硬さ」と「付着性」が高値になった．「硬さ」は，ゾルが水の約２倍，ゼ

Table 1.　Mechanical properties of food samples

Sample	Hardness (kPa)	Cohessiveness	Adhessiveness (J/m^3)	Fracture Stress (kPa)	Fracture Energy (kJ/m^3)
Water	0.166 a	*0.998 e*	14.1 c	nf	nf
Sol	0.334 a	*0.907 d*	42.1 c	nf	nf
Jelly	1.46 a	0.341 a	25.0 c	1.46 a	0.158 a
Cheese	332 b	0.606 c	78100 a	258 b	29.6 b
Agar Gel	593 c	0.393 b	47400 b	593 c	54.4 c

Mean values of more than 3 replicates.
nf, not fractured.
'Cohessiveness' of liquid samples written in *italics* relates to fluidity and does not mean cohesive property.
Mean values followed by a different alphabetical letter were significantly different as determined by Tukey's multiple comparison test.
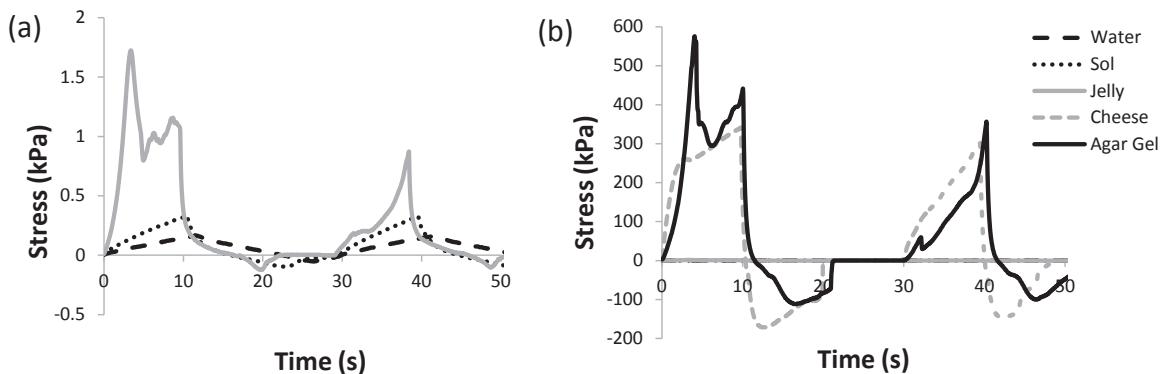
Fig. 2　Texture profile curves of five food samples

(a) Sample in a cup（ϕ40 mm × 15 mm）is compressed using a cylindrical probe（ϕ20 mm）.
(b) Sample（15 mm thick）is penetrated using a cylindrical probe（ϕ3 mm）.

リーが約10倍であった．ゼリーは第１バイトの圧縮途中で破壊された．「凝集性」は水＞ゾル＞ゼリーと小さくなり，水の値はほぼ１だった．容器に入れた水は瞬時に流動し，元の形に戻るため第２バイトは第１バイトと同じ波形になる．ゾルでは圧縮後元の状態に戻るまでに時間がかかるが，本実験条件（圧縮速度1 mm/s）では第２バイトまでにほぼ回復しているため「凝集性」値は0.907となった．しかし，もし速度が速ければ，第２バイトまでに十分な時間がなく，見かけの「凝集性」値が低くなる．ここでは水とゾルの「凝集性」は，凝集しやすさではなく，明らかに流動しやすさを示しており，本来の意味とは異なる[12, 14]．

歯を用いて咀嚼する食品では，Fig. 2(b) のようなテクスチャー測定波形が見られた．これらの食品は，水に対して荷重は約100倍，応力は，プランジャーの大きさが異なるため，1000倍以上高くなった．Table 1に示すように，寒天ゲルとチーズを比較すると，「硬さ」は寒天ゲル，「凝集性」および「付着性」はチーズの方が高くなった．

水やゾルは液体であり，容器に入れないと形を保てない．舌で押せば流れ，口腔内で同じ場所に留まってはいない．実際に水は直ちに嚥下された．一方，食品の種類が異なっても，舌と口蓋で食品を十数％ほど圧縮し，口腔内で認知されたテクスチャーによって食べ方が決定される[16]．濃厚なゾルや軟らかいゼリーのような場合は，液体か固体かで摂食様式が分かれるのではなく，口腔内において同じような変形がまず与えられると考えられる．液体と固体試料を同じ条件で力学機器測定することは困難だが，ほとんどの食品はその中間の性質を示すものであり，必ずしも異なる摂食様式になるとは限らない．

２．ヒト測定結果

Fig. 3 は食いしばった時(左)と開口時(右)の筋活動の例である．食いしばる時には閉口筋である咬筋筋電位が大きく現れ，開口時には開口筋である舌骨上筋群筋電位が出現した．咬筋の筋音は閉口，開口の開始と終了時に短く観察された．本研究では加速度を検出しているが，音のセンサを用いて食いしばり時に報告されている[10]のと同様のタイミングで筋音が検出された．

Fig. 4 は，水，ゾル，ゼリーの測定結果の例である．水は直ちに嚥下され，閉口筋筋電位がほとんど観察されなかった．ゾルは複数回の嚥下が行われることも多く，この例では３回嚥下されている．舌骨上筋群が嚥下毎に働いており，そのタイミングで，弱い咬筋活
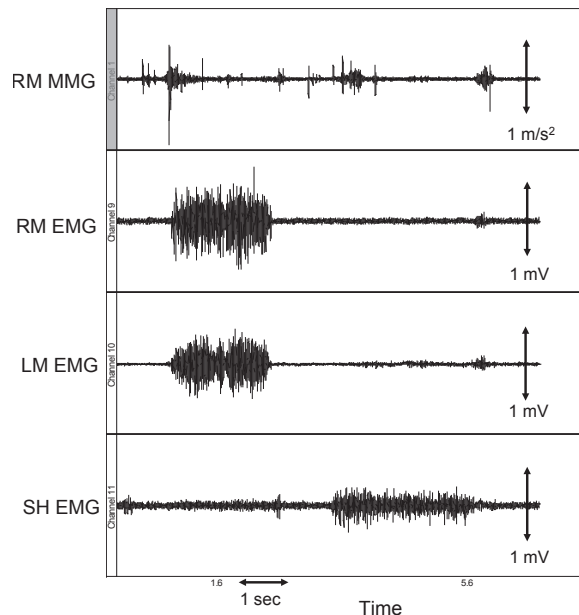
Fig. 3　MMG and EMG signals during clenching and jaw opening

From top to bottom, mechanomyogram of the right masseter muscle, electromyogram of right and left masseter muscles, and electromyogram of suprahyoid muscles.

動が認められた[17]．ゼリーでは，摂食時間が数秒と長く，口の中にゼリーが留まり，咬筋筋電位が明らかではないことから，舌で何回か潰された後で嚥下されている[17]ことが示唆される．いずれも筋音信号は，筋電位バーストより数が多く見られる．

歯で噛まれる食品として，寒天ゲルの咀嚼と嚥下時の測定例をFig. 5 に示す．咬筋と舌骨上筋群の筋電位が高頻度で現れており，咀嚼していることが示されている．右側は時間軸を拡大したものであるが，１秒よりも短い周期で閉口筋と開口筋の筋電位が交互に出現していることが解る．振幅は閉口筋の方がシャープである．同じ右咬筋からの筋音は筋電位に対し，２倍の回数，ほぼ筋電位バーストの活動開始期と終了時に出現した．

Fig. 6 は同一被験者のチーズ咀嚼時の計測データである．「付着性」や「凝集性」の大きいチーズは，寒天ゲルよりも咀嚼後半，一回目の嚥下後，律動的な咬筋筋電位が観察されなくなってからの時間が長かった．

以上の測定結果に関して統計処理を行い，食品試料間に有意差が認められたものをTable 2 に示す．咀嚼周期は，閉口筋の筋音，閉口筋及び開口筋の筋電位のどれからも求められ，ほぼ同等の値となる．非活動期が明確で，精度良く活動時間を決定できるのは，閉口筋筋電位だったため，Table 2 の咀嚼周期，咀嚼回数は咬筋筋電位から求めた値である．嚥下回数は，有意差は認められなかったが，チーズで最も高値の2.4回，寒天ゲルが1.9回，水が最も少なく1.1回であった．チーズと寒天ゲルはどちらも咀嚼回数が30回で，有意差は認められないが，咬筋筋電位の平均振幅及び筋活動量総和は寒天ゲルの方が大きく，舌骨上筋群の筋電位平均振幅（表には示していない），筋活動量総和及び嚥下回数はチーズの方が大きかった．このことは「硬さ」値の高い寒天ゲルがより大きな咬筋活動を要し，「付着性」「凝集性」の高いチーズがより大きな舌骨上筋群の活動を要することを示唆している[6, 15, 18]．

３．筋電図と筋音図の比較

表面電極を用いた筋電図，筋音図とも，測定の行いやすさ，被験者の負担の小ささから考えて，食品研究分野における摂食時の生理学的計測法として実用可能と考えられた．筋電位と筋音の同時計測は，咬筋では
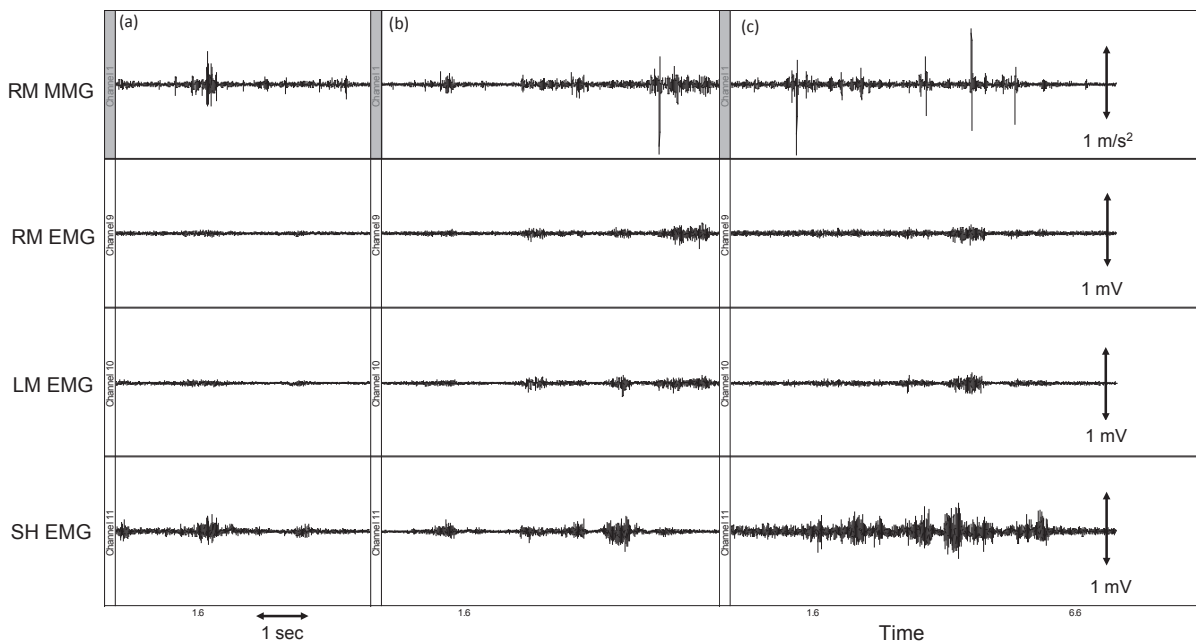
Fig. 4　MMG and EMG signals for（a）water,（b）sol, and（c）soft jelly samples

Channels and subject are the same as Fig. 3.
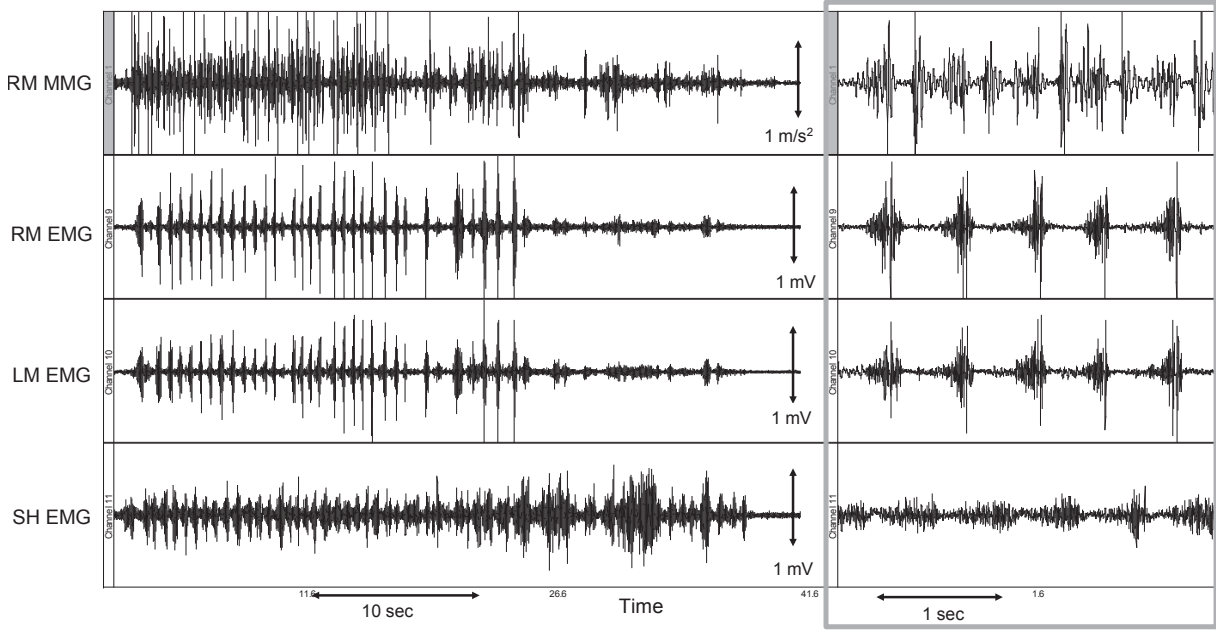
Fig. 5　MMG and EMG signals for agar gel

The right side is a part for recording enlarged time scale. Channels and subject are the same as Fig. 3.
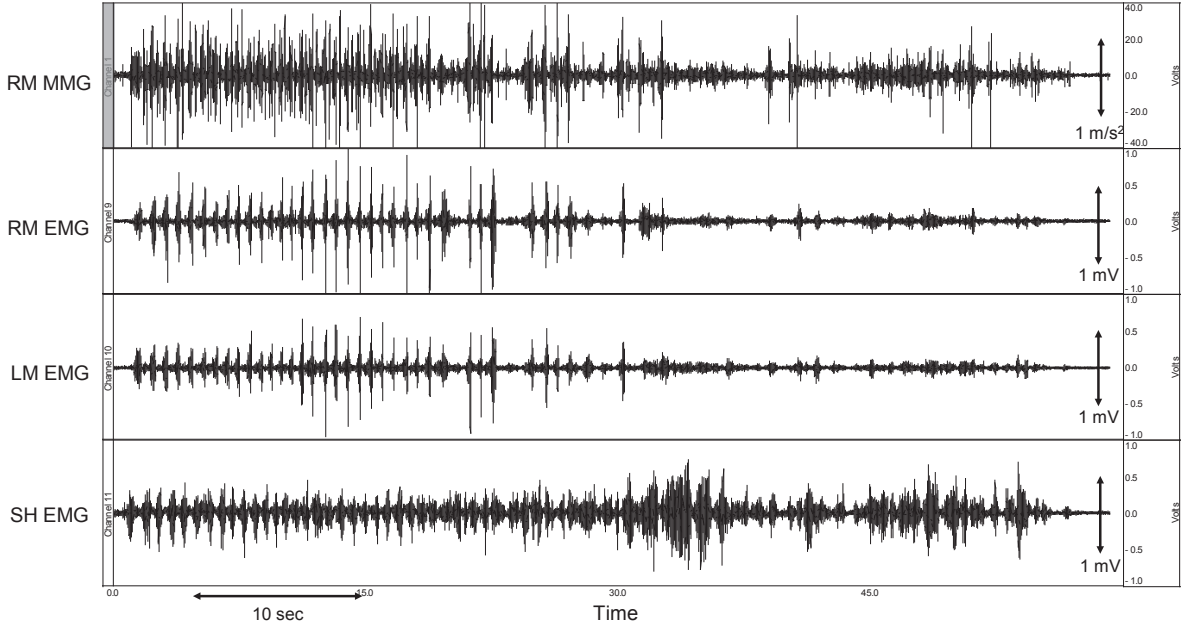
Fig. 6　MMG and EMG signals for cheese

Channels and subject are the same as Fig. 3.

Table 2. Mastication parameters for different food samples

Sample	Number of chewing cycles	Chewing cycle（s）	Mean EMG amplitude of masseter muscles（mV.s）	Mean EMG duration of masseter muscles（s）	Total EMG activity of masseter muscles（mV.s）	Mean EMG duration of suprahyoid muscles（s）	Total EMG muscle activity of suprahyoid muscles（mV.s）
Water	1.1 a	nd	0.513 ab	0.796 b	0.029 a	0.927 b	0.053 a
Sol	1.7 a	1.37 b	0.462 a	0.550 ab	0.035 a	0.827 b	0.070 a
Jelly	3.7 a	0.908 a	0.441 a	0.517 ab	0.057 a	0.632 ab	0.096 a
Cheese	30.1 b	0.714 a	1.03 bc	0.324 a	0.808 b	0.399 a	0.876 b
Agar Gel	29.6 b	0.702 a	1.34 c	0.309 a	0.935 b	0.422 a	0.748 b

Mean values of 9 subjects × 2 replicates.
nd, not determined.
Significantly different parameters among 5 samples determined by one-way analysis of variance are listed.
Mean values followed by a different alphabetical letter were significantly different as determined by Tukey's multiple comparison test.

可能だったが，舌骨上筋群は筋肉が小さく装着する場所が取れなかった.

食品を歯で噛む場合には，閉口筋である咬筋と開口筋である舌骨上筋群の筋電位が交互に出現した．硬い食品ほど，咬筋筋電位の振幅が高いこと，「付着性」が高い食品では舌骨上筋群筋電位が強いことが示された．嚥下時には，大きな舌骨上筋群筋電位と，弱い咬筋筋電位が認められた．これらから舌骨上筋群筋電位は舌の咀嚼中及び嚥下時の活動を反映していると考えられる.

咬筋からの筋音信号は，咬筋筋電位の発生開始時と休止時に出現した．どちらの方法も咀嚼運動の検出ができ，咀嚼リズムが咀嚼後期に長くなる現象が観察された．しかし，食品の物性が異なっても筋音振幅には有意差が認められなかった．自然な咀嚼周期は，歯で噛む食品では１秒に満たず、軟らかい食品を舌で扱う場合の周期はやや延びる（Table 2）．一方，２～３秒間食いしばる時（Fig. 3左）は，律動的な咀嚼より強い咬合力を生じていても，動作が遅い場合は，筋音振幅は小さかった．筋音図は咀嚼力に関する項目の解析には適さないと考えられた.

筋の収縮に伴う加速度を検出する筋音測定では，疲労の影響を解析する等，別の目的であれば有効である場合もあろう．例えば高齢者や障害者等，摂食能力が低い者にとっては負荷が高いような食品の探索に利用できる可能性もある.

以上の結果から，筋音図よりも筋電図の方が情報量が多く，力学特性を変えた食品の咀嚼過程を分析するには適していることが示唆された.

要　約

液体からゲルまでの多様な力学的特性をもつ食品６gを自然に摂食する時の，代表的な咀嚼筋である咬筋の筋電位と筋音を同時計測した.

一回噛みしめる毎に，咬筋の筋電位が発生し，筋の収縮前後に筋音が発生した．どちらの方法でも咀嚼回数や咀嚼時間，咀嚼運動に関する情報が得られた．一方，強い咀嚼力が必要な硬い食品で筋電位振幅が増加したが，筋音振幅は対応していなかった．筋音図からは咀嚼力の強さは解析できないことが示唆された.

本研究は農林水産省実用技術開発事業（22026）の助成を受けて行い，一部は日本食品科学工学会第58回大会において発表した.

参考文献

1）Chen, J.，Food oral processing – a review. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1-25（2009）.
2）神山かおる，テクスチャー解析によるおいしさの評価，化学と生物，**47**，133-137（2009）.
3）竹村元秀，古郷幹彦，高橋智子，柳沢幸江，神山かおる，熊谷仁，谷米温子，森高初惠，畑江敬子，咀嚼と嚥下「進化する食品テクスチャー研究」，山野善正監修（エヌ・ティー・エス，東京），137-229（2011）.
4）神山かおる，食品の口腔プロセスの解析，化学工学，**77**，91-94（2013）.
5）塩澤光一，筋電図「食感創造ハンドブック」，西

成勝好，大越ひろ，神山かおる，山本隆編（サイエンスフォーラム，東京），251-258（2005）.

6）Espinosa, Y. G. and Chen. J., Applications of electromyography（EMG）technique for eating studies, in Food Oral Processing, Chen, J. and Engelen, L. eds（Wiley-Blackwell, Oxford, UK），289-317（2012）.

7）三田勝巳，筋音図の基礎と応用(1) －概要と計測・解析－，臨床脳波，**44**，532–542（2002）.

8）Bajaj, P., Madeleine, P, Sjøgaard, G. and Arendt-Nielsen, L., Assessment of postexercise muscle soreness by electromyography and mechanomyography, *J. Pain*, **3**, 126–136（2002）.

9）Cramer, J. T., Housh, T. J., Weir, J. P., Johnson, G. O., Berning, J. M., Perry, S. R. and Bull, A. J., Gender, muscle, and velocity comparisons of mechanomyographic and electromyographic responses during isokinetic muscle actions, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **14**, 116-127（2004）.

10）L'Estrange, P. R., Rowell, J. and Stokes, M. J., Acoustic myography in the assessment of human masseter muscle, *J. Oral Rehabil.*, **20**, 353–362（1993）.

11）Lee, J., Chau, T. and Steele, C. M., Effects of age and stimulus on submental mechanomyography signals during swalllowing, *Dysphagia*, **24**, 265-273（2009）.

12）高智紅，谷脇満，島田宏美，石原清香，船見孝博，神山かおる，力学的特性の異なる食品の嚥下時舌運動の超音波画像解析．日本食品科学工学会誌，**59**(12)，604-610（2012）.

13）厚生労働省，医薬食品局食品安全部長通知：特別用途食品の表示許可等について．食安発第0212001号（2009）.

14）野内義之，安食雄介，飛塚幸喜，佐々木朋子，神山かおる，２バイトテクスチャー試験における測定速度条件の検討，日本食品科学工学会誌，**59**，96-103（2012）.

15）Kohyama, K., Hayakawa, F., and Sasaki, T., Relations between mastication variables, mechanical properties and sensory scores of cheese samples with various textures. in Gums and Stabilisers for the Food Industry 16, P. A. Williams and G. O. Phillips eds.（Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK），331-338（2012）.

16）Arai, E. and Yamada, Y., Effect of the texture of food on the masticatory process. *Jpn. J. Oral Biol.*, **35**, 312-322（1993）.

17）Ishihara, S., Nakauma, M., Funami, T., Tanaka, T., Nishinari, K., and Kohyama, K., Electromyography during oral processing in relation to the mechanical and sensory properties of soft gels. *J. Texture Studies*, **42**, 254-267（2011）.

18）Çakir, E., Koç, H., Vinyard, C. J., Essik, G., Daubert, C. R., Drake, M., and Foegeding, A., Evaluation of texture changes due to compositional differences using oral processing. *J. Texture Studies*, **43**, 257-267（2012）.

国連大学生研究成果

Effects of heat moisture treatment on physical properties and textural quality of food products from Arenga and Sago starches

Dede R. Adawiyah

UNU-Kirin Fellow from Indonesia
Food Physics Laboratory
National Food Research Institute, NARO

Palm starch is important source of starch in Indonesia prepared from the pith of several genera of palm such as *Metroxylon* (spesies *Metroxylon Sago*) and *Arenga* (spesies *Arenga pinnata*). Characterization of sago starch from *Metroxylon sago* has been extensively studied, while information about arenga starch was very limited. Native starch usually has limited functional properties for certain processing such as dough development and textural quality. The physical modification such heat moisture treatment (HMT) is potential to improve the physicochemical properties of native starches. It is generally expected safer, less expensive and more ecological way than chemical modification. The objectives of research were (1) to compare some physical properties (rheological, gelling, thermal and swelling properties) of native arenga and sago starches and (2) to clarify the effects of HMT on physical properties of arenga and sago starches.

The results showed that amylose contents of arenga and sago starches were not significantly different at approximately 38%. Peak gelatinization temperature was also similar at approximately 67℃, but arenga starch showed a narrower range of gelatinization temperature than sago. The swelling power capacity of sago starch was higher than that of arenga. Arenga and sago starches at low concentrations showed shear thinning behavior, and sago formed more viscous sol than arenga. Based on frequency dependence of dynamic viscoelasticity, minimum concentration of sago starch for gel formation was 1.8% whereas that of arenga starch was 2.4%. At high concentrations, gel from arenga for gel formation starch was more rigid than that of sago. The breaking properties and texture profile of gels made from arenga and sago starches were also clearly different. Sago starch is more suitable as a thickener, while arenga starch is more suitable as gelling agent.

Optimum HMT for arenga and sago starches were determined at 120℃, 20% moisture content and heating time was 90 min and 60 min for arenga and sago starch, respectively. HMT altered all physical properties of native arenga and sago starches. HMT of starch shifted gelatinization curve to higher temperature and reduced gelatinization enthalpy. The minimum concentration for gel formation of HMT starches were increased to 4.2% and 4.5% for arenga and sago, respectively. Swelling power, pasting, rheological and textural properties of HMT starches were also significantly changed. HMT sago starch exhibited weak gel characteristics with narrow linear viscoelastic region. HMT promoted retrogradation in arenga and sago starches.

Both starches and the HMT modified samples showed different physicochemical characteristics, thus new utilization besides the traditional noodles and cakes is expected. The application of those starches for food processing is planned in the follow-up studies.

Enzymatic preparation of glycosides from free sugars

Jinxiang Zhang

UNU-Kirin Fellow from China
Enzyme Laboratory
National Food Research Institute, NARO

Human milk oligosaccharides (HMOs) are important for the healthy growth of infants, since HMOs could act as the bifidus factor to obtain preferential bifidobacterial growth in intestine of breast-fed infants. The major components of HMOs are Type I sugars such as lacto-*N*-tetraose (Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc, LNT), which contain lacto-*N*-triose II (GlcNAc β1-3Gal β 1-4 Glc, LNTri) structure at their non-reducing ends. The type I dominant composition of milk oligosaccharides is a specific feature of human milk, and not other mammals. We have tried to establish a practical enzymatic method to prepare LNTri in one pot. Finally we successfully prepared LNTri from lactose and UDP-GlcNAc using β1, 3-*N*-acetylglucosaminylt ransferase (GlcNAcT) coupled with a UDP-GlcNAc-regeneration system.

Biochemical approaches to evaluate the biological activity of legume seeds and other foods

Yadahally Nareppa Sreerama

UNU-Kirin Fellow from India
Nutritional Function Laboratory
National Food Research Institute, NARO

Legumes and nuts, besides their nutritional importance possess many bioactive phytochemicals, which may exert different health-promoting effects in reducing the risk of various oxidative stress-induced diseases. Alpha-glucosidase and pancreatic lipase are key enzymes involved in intestinal glucose and triglyceride absorption, respectively. Inhibition of these enzymes could be a key strategy in the control of hyperglycemia (diabetes) and heperlipidemia (obesity). Phenolic extracts of various legumes and nuts were evaluated for their antioxidant properties and inhibitory activities against α-glucosidase and pancreatic lipase. Mung bean seed coat which contains highest concentrations of phenolic compounds was found to be the most active scavenger of free radicals and also possess highest inhibition against α-glucosidase and lipase activities. Significant contribution from adzuki bean varieties and walnut were also noted in antioxidant capacities and enzyme inhibitory activities. HPLC analysis and identification of the active compounds indicated that C-glycosyl flavonoids, vitexin and isovitexin were the main contributors to the inhibitory activities of mung bean seed coat. However, vitexin, isovitexin and anthocyanins largely contributed to the bioactive functional properties of adzuki bean varieties. In addition, ellagic acid, gallic acid and flavan-3-ols, which are predominant in walnut showed higher inhibitory activities. Furthermore, results also demonstrated that the presence of glucose residue at 6 or 8 position of flavonoid A ring is more favorable for α-glucosidase inhibition and the hydroxyl substitution on B ring of anthocyanidins enhanced the inhibitory activity. In addition, the presence of galloyl moieties within the structure of flavan-3-ols was more responsible for α-glucosidase and lipase inhibitory activities. The results generated from this study may help to exploit the use of legumes and nuts as functional food ingredients for promoting health.

Study on Phytochemical of Extract from Thai Tropical Fruit and Its Byproduct

Udomlak Sukatta

UNU Kirin Fellow from Thailand
Food Processing Laboratory
National Food Research Institute, NARO

Xanthone compounds in mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) fruit have been reported to have biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. The objectives of this research were to investigate qualitative and quantitative evaluation of xanthones in each part of mangosteen fruit and find effective method to prepare useful extract as food material which garantees high concentration of xanthones from mangosteen. Purification of the hexane extract of dried mangosteen peel was led to the isolation of two main xanthone compounds, α-mangostin and γ-mangostin which were separated by using silica gel column chromatography, and their structures were determined using NMR techniques. Quantitative evaluation of α-mangostin and γ-mangostin by using HPLC showed that extract from all parts of mangosteen fruit contained α-mangostin range from 2.05 to 382.24 and γ-mangostin range from 0.27 to 144.87 mg/g in solid base, respectively. The antioxidant activities were evaluated for ethanol extract of all parts in term of both DPPH and FRAP bioassay. Ethanol extract of yellow gum and dried peel of mangosteen showed high activity in these assays. The results from DPPH and FRAP assays showed that γ-mangostin was a major contributor to antioxidant capacities. The effective method to extract xanthone compounds from dried mangosteen peel in large scale was soaking and grinding method with 100 % ethanol, which gave 64 and 44 % recovery rate of α-mangostin and γ-mangostin, respectively. It was suggested that ethanol extract of mangosteen peel can be used for supplement or valuable material of processed foods.

Study of effective components of some vegetables in *Allium* on life-style disease

Xiaofeng ZHANG

UNU Kirin Fellow from China
Nutritional Function Laboratory
National Food Research Institute, NARO

This study using *in vitro* analysis provides insight about antioxidative activity and key enzymes relevant to hyperglycemia and obesity inhibitory effect of methanol extracts from seven *Allium* vegetables in relation to their total phenolic content, total flavonoid content and phenolic components.

The Onion Skin exhibited the highest 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capability, followed with Onion Outer Layer, Chives Leaf and Garlic Chives. Total phenolics content in seven *Allium* vegetables ranged from 22.06 mg GAE/100g DW (Chinese Onion) to 983.18 mg GAE/100g DW (Onion Skin). Onion and Garlic Sprout, which have the higher total flavonoid content, the inhibitory activity of α-glucosidase were also at the higher level. Chives and Onion exhibited higher lipase inhibitory activities. Garlic which showed the very lower α-glucosidase inhibitory activity, was found a certain lipase inhibitory activity.

The effective phenolic components rutin, quercetin-3-D-glucoside, quercetin, kaempeferol, ferulic acid were quantified by HPLC with UV detector. Garlic is the only one that contained none of the flavonols (quercetin, rutin, kaempeferol, quercetin-3-D-glucoside). Onion skin are richer in quercetin (156.8 mg/kg DW) and kaempeferol (71.6 mg/kg DW), while Green Onion Leaf are richer in rutin (611.2 mg/kg DW) and ferulic acid (91.7 mg/kg DW). Garlic Sprout has the highest concentration of quercetin-3-D-glucoside with value of 145.1 mg/kg DW.

Onion, Green Onion, Chieves and Garlic Sprout may be recommended for their major potential functional properties.

抄　録

Separation and Purification Technology, 88, 216-226 (2012)

Analysis of transport mechanism on binary organic solvent system through a PDMS-based dense membrane using a regular solution model combined with a solution-diffusion model

Atsushi Miyagi*[1], Hiroshi Nabetanib*[2], Mitsutoshi Nakajima*[3]

*[1] Chiba Industrial Technology Research Institute
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では，regular solutionモデルとsolution diffusionモデルを用いて，アルコール–ヘキサン系，アルカン–ヘキサン系，脂質–ヘキサン系および軽油–ヘキサン系といった二成分系がPDMS素材とする緻密膜を透過する際のメカニズムを解析した．この統合モデルは，拡散係数，膨潤度，膜厚，浸透圧といった膜透過に関する重要な要素を考慮に入れており，本モデルを用いることにより，二成分系の膜透過のメカニズムを良好に表現できることが明らかになった．

regular solutionモデルとsolution diffusionモデルを統合したモデルを用いた有機二成分系の膜透過メカニズムの解析

宮城　　淳*[1]，鍋谷　浩志*[2]，中嶋　光敏*[3]

*[1] 千葉県産業支援技術研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 筑波大学大学院生命環境科学研究科

食品総合研究所研究報告，76，45-50（2012）

ダイズ種子エポキシド加水分解酵素変異体の作出及びその性質検討

荒平正緒美*，Benjamin Sailas**，Sam-Pin Lee**，Ngoc Minh Nghiem**，Van Chi Phan**，深澤　親房**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 元農研機構食品総合研究所

真菌に対する種子の生態防御のため，天然の殺菌剤と考えられている物質の中には，様々なエポキシ脂肪酸及びそれらの誘導体が含まれる．これらの構成要素となるエポキシドについてはその生合成経路やその分解経路が報告されて来ており，これらの経路を構成する酵素群の１つがエポキシド水解酵素（EH）である．エポキシド水解酵素は，エポキシドを加水分解し，ジオール体に変換する触媒作用を示す．ダイズ種子からクローニングしたエポキシド水解酵素を大腸菌体内で発現させ，部位特異的変異体の作出を試み，22種の変異酵素を構築し，６種の可溶性変異酵素が得られた．得られた変異酵素の内，ゲノム上極めて高度に保存されている領域に変異を有する３種の酵素については，野生型酵素の２倍近い酵素活性が得られた．野生型酵素及び変異酵素のCDスペクトルを測定した結果，顕著な差異は見られなかった．変異による酵素活性の上昇はアミノ酸変異による微少な変化を反映しているものと予想された．

Characterization of soybean epoxide hydrolase mutant

Masaomi Arahira*, Benjamin Sailas**, Sam-Pin Lee**, Ngoc Minh Nghiem**, Van Chi Phan** and Chikafusa Fukazawa**

* National Food Research Institute, NARO
** Former National Food Research Institute, NARO

Jouranl of Separation Science, 34, 3546-3552 (2011)

Metabolic profiling of beta-cryptoxanthin and its fatty acid esters
by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry

A. Matsubara*[1,] *[5], Y. Wada*[1], Y. Iwasaki*[2], S. Morimoto*[3], T. Ookura*[4], E. Fukusaki*[1], T. Bamba*[1]

*[1] Graduate School of Engineering, Osaka University
*[2] Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University
*[3] Ehime Institute of Industrial Technology
*[4] National Food Research Institute NARO
*[5] Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

トリプル四重極マスに連結した超臨界クロマトグラフィーを用いてβクリプトキサンチン及びその脂肪酸エステル体の代謝物を高スループット・高感度で分析するシステムを構築した．βクリプトキサンチン及び９つの脂肪酸エステル体はODSカラムを用いて20分以内で分離することができ，検出限界はフリー体で540 fmol，エステル体で32-30 fmolと，従来法よりも感度と分析時間の面で優れていた．このシステムを利用して，柑橘果皮よりβクリプトキサンチンと5種のエステル体の検出に成功し，そのエステル体の構成比は品種間による差が認められた．ここで開発された方法は，キサントフィルのエステル体の解析を進めるのに強力な手法となりうる．

トリプル四重極マス連結超臨界クロマトによるβクリプトキサンチンとその脂肪酸エステルの代謝物解析

松原　惇起*[1,] *[5]，和田　雄介*[1]，岩崎　雄吾*[2]，森本　　聡*[3]，大倉　哲也*[4]，福崎英一郎*[1]，馬場　健史*[1]

*[1] 大阪大学工学研究科
*[2] 名古屋大学農学研究科
*[3] 愛媛県産業技術研究所食品産業技術センター
*[4]（独）農研機構　食品総合研究所
*[5] 日本学術振興会特別研究員DC

Food Science and Technology Research, 18 (1) , 119 (2012)

Effect of dietary fat on methylmercury accumulation, antioxidative defense, and lipid profile in adult mice with exposure to low levels of MeHg

Nobuya SHIRAI*[1,] *[2], Kohji YAMAKI*[1], Yumiko YAMASHITA*[3], Michiaki YAMASHITA*[3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Institute of Vegetable and Tea Science NARO
*[3] National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency

食事脂肪と低レベル塩化メチル水銀暴露のマウス組織における抗酸化性因子と水銀蓄積に対する相互作用を調べるため，マウス（雄，４ヵ月齢）に，４ヵ月間0，1，2 ppmの塩化メチル水銀添加５％のラードまたは魚油食を与えられた．塩化メチル水銀の低レベル暴露は血漿アスコルビン酸濃度を有意に減少させた．それは食事脂肪と関係なく，脳の抗酸化効果の影響ではなかった．全水銀濃度は，ラード食群のそれらと比較して，魚油食群の筋肉で有意に低く，血漿値でより高かった．脳の水銀含有量は，食事脂肪によってほとんど影響されなかった．これらの結果から，食事脂肪が筋肉で水銀蓄積に影響する可能性を示唆し，低レベル塩化メチル水銀暴露によって誘導される酸化性因子にはほとんど影響しないことが示唆された．

低レベルメチル水銀暴露成熟マウスでのメチル水銀蓄積，抗酸化，脂質代謝に対する脂肪食の効果

白井　展也*[1,] *[2]，八巻　幸二*[1]，山下由美子*[3]，山下　倫明*[3]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2]（独）農研機構野菜茶業研究所
*[3]（独）水産総合研究センター中央水産研究所

Food Science and Technology Research, 17 (6), 567 (2011)

Inhibition of angiotensin-converting enzyme by components of traditional mongolian fermented milk products

Dolgorsuren BAYARSAIKHAN*, **, Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA*, Nobuya SHIRAI*, Yoko TAKAHASHI*, Kohji YAMAKI*

* National Food Research Institute, NARO
** Clinical Nutrition Department, Shastin Central Hospital

アンジオテンシン変換酵素（ACE）抑制ペプチドは，乳製品で発見されている．多くの伝統的乳製品が，モンゴルには存在する．この研究では，いくつかのモンゴルの乳製品は集め，これらの試料のACE阻害活性をテストした．馬乳から作られるaaruulに活性が確認された．この試料を透析とHPLCによる精製を行い，その分画の分子量を，質量分析により362.05と決定した．精密質量分析の結果から，aaruulの活性物質は，5′−GMPであると確認された．5′−GMPの抑制活性は，酸乳の活性ペプチドや他の報告されているフラボノイドと比較してそれほど高くはなかった．しかし，これは，5′−GMPがACE活性を抑制することを示した最初のレポートである．これらの結果は，高血圧治療薬の開発に役に立つものと推測される．

伝統的なモンゴル産発酵乳中のアンジオテンシン変換酵素阻害活性

ドルゴルスレン・バイヤルサイカハン*,**，亀山眞由美*，白井　展也*，高橋　陽子*，八巻　幸二*

*（独）農研機構食品総合研究所
**シャステン中央病院臨床栄養部

The Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (16), 8976-8984 (2011)

Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats

Yoko Takahashi* and Tomokazu Konishi**

* National Food Research Institute, NARO
** Akita Prefectural University

大豆食品は脂質異常症や関連する疾患を予防する食品として推奨されているが，大豆中の成分がどのようにして作用を示すのかは明らかでない．本研究では，豆腐（凍り豆腐）と，凍り豆腐中の作用成分と予想される大豆タンパク質とイソフラボンが，雄ラットの脂質代謝に及ぼす影響を比較した．凍り豆腐と大豆タンパク質は，カゼインと比べて血清中の中性脂肪とコレステロール濃度を有意に低下させたこと，マイクロアレイ解析により，血清脂質を合成する主要な組織である肝臓で，脂肪酸およびステロイド合成に関わるトランスクリプトームを集中的に変化させることが明らかになった．一方，イソフラボンは血清脂質濃度や遺伝子発現にはほとんど影響がなく，大豆タンパク質や凍り豆腐との相乗効果も示さなかった．凍り豆腐中のタンパク質成分の作用は，脂質合成関連酵素の活性が低下したことからも確認された．これらの結果から，大豆のイソフラボンではなく，タンパク質が遺伝子発現レベルで肝臓での脂質合成を抑制し，これが血清脂質濃度を低下させるとの結論に達した．

豆腐（凍り豆腐）は主にイソフラボン成分ではなくタンパク質成分がラットの血清脂質濃度を低下させ，
肝臓の脂質合成関連の遺伝子発現を変化させる

高橋　陽子*，小西　智一**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 秋田県立大学

Analytical Sciences, 27 (2), 159-165 (2012)

Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts

Jun Watanabe*1, Tomoyuki Oki*2, Jun Takebayash*3, Koji Yamasaki*4, Yuko Takano-Ishikawa*1, Akihiro Hino*1 and Akemi Yasui*1

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO
*3 National Institute of Health and Nutrition
*4 Taiyo Kagaku Co.,

水溶液の抗酸化能評価に用いる親水性酸素ラジカル吸収能評価法（H-ORAC）を改良（改良法AおよびB）し，それぞれ５種類の抗酸化物質および農産物抽出液を用いて室間共同試験を行った．ハーモナイズドプロトコルに則り，試験を行ったところ，改良法Aでは併行標準偏差が4.6-18.8%，室間再現相対標準偏差 RSD(R)(%) が7.0-21.1%，HorRatが0.40-1.93であった．しかし，測定法にまだ問題点が残っていたことから，さらに改良を重ねた改良法Bではそれぞれ1.8-9.4%，4.4-13.8%となり最終的にHorRatが全ての試料で1.3以下となったことから，精度の良いH-ORAC評価法であることが確認された.

抗酸化物質および食品抽出物の抗酸化能評価に用いる改良親水性酸素ラジカル吸収能評価法の室間共同試験による妥当性確認

渡辺　　純*1，沖　　智之*2，竹林　　純*3，山崎　光司*4，石川（高野）祐子*1，日野　明寛*1，安井　明美*1

*1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 (独) 農研機構九州沖縄農業研究センター
*3 (独) 国立健康・栄養研究所
*4 太陽化学株式会社

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75 (9), 1649-1653 (2011)

Production of starch with antioxidative activity by baking starch with organic acids

Shoji Miwa*1, Megumi Nakamura*1, Michiko Okuno*2, Hisako Miyazaki*2, Jun Watanabe*3, Yuko Ishikwawa-Takano*3
Makoto Miura*4, Nao Takase*4, Sachio Hayakawa*5, Shoichi Kobayasi*5

*1 Ishikawa Agricultural Research Center
*2 Iwata Chemikacl Co., Ltd.
*3 National Food Research Institute, NARO
*4 Iwate University
*5 Japan Confectionery and Innovative Food Ingredients Research Center

コーンスターチを有機酸とともに加熱することにより抗酸化能を有するデンプンを作成し，ANOX糖（antioxidant糖）と命名するとともに，その抗酸化能をDPPH法により測定した.
焼成温度および時間をそれぞれ170℃，60分に固定して，いくつかの有機酸で検討したところ，フィチン酸によるANOX糖が最も高い抗酸化能を示したが，焼成後の色は黒色となった．そのため，L-酒石酸を用いて作成した２番目に抗酸化能の高いANOX糖が最も利用しやすいと考えられた，この糖は光や温度，あるいは酵素抵抗性が高かった．ANOX糖の抗酸化能は水分含量やpHによって変化するが，熱水や窒素ガスによる処理，あるいはpHの調整により安定化する.

デンプンを有機酸と加熱することによりデンプンに抗酸化能を負荷する

三輪　章志*1，中村　恵美*1，奥野美智子*2，宮崎　久子*2，渡辺　　純*3，石川（高野）祐子*3，三浦　　靖*4
高瀬　奈緒*4，早川　幸男*5，小林　昭一*5

*1 石川県農業総合研究センター
*2 磐田化学工業株式会社
*3 (独) 農研機構食品総合研究所
*4 岩手大学
*5 社団法人菓子・食品新素材技術センター

Japan Agricultural Research Quarterly, 46 (1), 81-87 (2012)

Antioxidant Potential of Green and Black Teas of Selected South India Cultivars

Yuko TAKANO-ISHIKAWA*, Jun WATANABE*, Masao GOTO*, Lingamallu Jagan Mohan RAO** and Kulathooran RAMALAKSHMI**

* National Food Research Institute, NARO
** Central Food Technological Research Institute

茶は世界中で最も消費されている飲料の一つであり，カテキンやテアフラビン，テアルビジンなどのポリフェノールには生体調節の機能が期待されている．
そこで，８つの茶系統からそれぞれ緑茶および紅茶を作成し，抗酸化能評価（DPPHラジカル消去活性および親水性酸素ラジカル吸収能）とポリフェノール含量測定を行った．
その結果，緑茶のH-ORAC値は2730-5031（umol TE（トロロックス当量）/g），紅茶は1429-2766，DPPHラジカル消去活性は緑茶で1098-1376（µmol TE/g），紅茶では508-798となり，同じ品種/系統では緑茶の法が高い傾向を示した．総ポリフェノール量とH-ORAC，あるいはDPPHラジカル消去活性の間には高い相関が見られたことから，茶の抗酸化能は主にポリフェールに由来するものと考えられた．

南インド産緑茶および紅茶の抗酸化能

石川（高野）祐子*，渡辺　純*，後藤　真生*，Lingamallu Jagan Mohan RAO** and Kulathooran RAMALAKSHMI**

*（独）農研機構食品総合研究所
**中央食品工業研究所（インド）

Biochemical and Biophysical Research Communications 410 (3), 654-658 (2011)

Caffeine lengthens circadian rhythms in mice.

Hideaki Oike*, Masuko Kobori*, Takahiro Suzuki**, Norio Ishida**

* National Food Research Institute, NARO
** National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST

カフェインは多くの動物で睡眠を変化させるが，概日リズムに影響するかは明らかになっていない．ここでは，哺乳類の培養細胞株であるヒト骨肉腫由来U2OS細胞，マウス繊維芽細胞NIH3T3細胞でカフェインが概日リズム周期を伸長することを見出した．Per2::Luciferaseレポーター遺伝子のノックインマウスより摘出した培養肝臓片でも，カフェインの添加により概日リズム周期長の伸長が確認され，哺乳類の概日時計中枢である視交叉上核（SCN）を含む脳切片の培養にカフェインを添加すると，位相後退が観察された．さらに，マウスにカフェイン溶液を１週間自由飲水させると，12時間の明暗周期下で肝臓の時計位相が後退し，恒暗条件下では行動の概日リズムの周期長が伸長した．われわれの結果は，細胞，組織，個体レベルで，カフェインが哺乳類の概日時計に影響を与えることを示した．

カフェインはマウスの概日リズムを伸長する

大池　秀明*，小堀真珠子*，鈴木　孝洋**，石田直理雄**

*（独）農研機構食品総合研究所
**（独）産総研

Biochemical and Biophysical Research Communications 416 (3-4), 362-366 (2011)

Endoplasmic reticulum stress enhances γ-secretase activity

Kazunori Ohta*, Akihito Mizuno*, Shimo Li*, Masanori Itoh*, Masashi Ueda*, Eri Ohta*, Yoko Hida*, Miao-xing Wang*
Manabu Furoi*, Yukihiro Tsuzuki*, Mitsuaki Sobajima*, Yoshimasa Bohmoto*, Tatsuya Fukushima*, Masuko Kobori**
Takashi Inuzuka*, Toshiyuki Nakagawa*

* Gifu University Graduate School of Medicine
** National Food Research Institute, NARO

小胞体は，３つの異なる細胞内シグナル伝達経路により，小胞体ストレスとなる変性タンパク質を処理する．ERストレスは，アルツハイマー病の危険因子である肥満及び糖尿病の発症に関わっているが，ERストレスがアルツハイマー病の進行に関わっているかどうかは不明のままである．本研究において，私達はERストレスがATF4を介したプレセニリン１の発現を誘導し，γ-セクレターゼ活性によるアミロイドβの分泌を誘導し，ケルセチンがUPRシグナルを修正してこれを抑制することを明らかにした．このことから，ERストレスは肥満や２型糖尿病により促進され，その結果，アルツハイマー病の発症に関わるγ-セクレターゼ活性を高めることが示唆された．

小胞体ストレスはγ-セクレターゼ活性を増幅させる

太田　和徳*，水野　彰人*，李　詩沫*，伊藤　正徳*，上田　昌史*，太田　瑛里*，樋田　陽子*，王　森星*
風呂井　学*，都築　行広*，傍島　光昭*，坊本　佳優*，福島　立也*，小堀真珠子**，犬塚　貴*，中川　敏幸*

* 岐阜大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Molecular Nutrition & Food Research 55, 530-540 (2011)

Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice

Masuko Kobori, Saeko Masumoto, Yukari Akimoto, Hideaki Oike

National Food Research Institute, NARO

C56BL6Jマウスにコントロール食（AIN93G）及び西洋型食（高コレステロール，高糖食）にそれぞれ0又は0.05％のケルセチンを添加した飼料を20週間摂取させた．その結果，ケルセチンを摂取させることにより，８週後に血漿のトリグリセリド及び肝臓の酸化ストレスマーカーTBARS，グルタチオンレベル及びPPARαの発現が改善した．また，20週後には内臓及び肝臓の脂肪蓄積が減少し，高血糖，高インスリン血漿，血中脂質異常，血中アディポネクチン及びTNFαレベルが改善した．肝臓の脂肪化に関与するPPARγ及びSREBP-1cの発現も正常に近づいた．ケルセチンはコントロール食を摂取したマウスの体重は減少させなかったが，血中のTNFα及び肝臓のTBARSレベルを減少させた．ケルセチンはおそらく酸化ストレス及びPPARαの発現を改善し，次いで肝臓の脂肪化に関わる遺伝子発現を抑制して，西洋型食で誘導される肝臓の脂肪蓄積及びメタボリックシンドロームに関連するパラメーターを改善したと考えられた．

ケルセチンの長期摂取は西洋型食でC57/BL6Jマウスで誘導される肝臓の脂肪蓄積を軽減する

小堀真珠子，升本早枝子，秋元由香里，大池　秀明

（独）農研機構食品総合研究所

PLos One 6 (8), e23709 (2011)

Feeding cues and injected nutrients induce acute expression of multiple clock genes in the mouse liver.

Hideaki Oike*[1], Kanji Nagai*[1,]*[2], Tatsunobu Fukushima*[2], Norio Ishida*[3], Masuko Kobori*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Mitsubishi Rayon Co. Ltd.
*[3] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST

概日時計はエネルギー代謝と密接に関連している．肝臓の時計は新しい食餌サイクルにすぐに適応するが，肺の時計は１週間ほどかかる．しかし，その組織特異性に関する分子機構はわかっていない．食餌に対する肝臓時計の即時応答を理解するため，Per2-lucレポーターのノックインマウスを利用して，１回の食餌遅延に対する影響を検討した．１週間夜間のみの制限給餌に馴化させ，最後の晩に，4，8，13時間遅延させて給餌を行った．肝臓時計の位相は全ての給餌遅延グループで遅延していたが，肺の時計は影響がなかった．次に，DNAマイクロアレイを使用して，時計遺伝子と代謝関連遺伝子の即時応答を検討した．Clock変異マウスを恒明条件で飼育し，内在の概日リズムを減弱させた，24時間の絶食後の８時間の再給餌による遺伝子応答を解析した．給餌後１時間以内に，Per2とDec1遺伝子の発現応答が見られた．リアルタイムPCRによる解析により，野生型マウスを一晩絶食させた後の再給餌でも同様の応答が見られた．Per2，Dec1遺伝子に加えて，Per1の発現上昇とRev-erbaの発現低下が肝臓では見られたが，肺では変化がなかった．さらに，グルコースとアミノ酸の混合栄養液の腹腔注射により，肝臓で同様の応答が見られたが，各単独の栄養液では見られなかった．われわれは，栄養情報により，肝臓では１時間以内に様々な時計遺伝子が応答することを明らかにした．

食餌摂取と栄養液の注射はマウスの肝臓で複数の時計遺伝子の即時発現を誘導する

大池　秀明*[1]，永井　寛治*[1,]*[2]，福島　達伸*[2]，石田直理雄*[3]，小堀真珠子*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 三菱レイヨン株式会社
*[3]（独）産総研

Bioscience and microflora 30 (3) 65-71 (2011)

Dihydrodaidzein-producing Clostridium-like intestinal bacterium, strain TM-40: Effects on in vitro metabolism of daidzein by fecal flora from human male equol producers and non-producers.

Motoi TAMURA, Sachiko HORI, Hiroyuki NAKAGAWA

National Food Research Institute, NARO

新鮮な健常人の糞便から単離されたジヒドロダイゼイン産生菌TM-40株は，Coprobacillus catenaformisと16S rRNAのホモロジーが93%の相同性がある新菌種であった．新鮮な健常人の糞便希釈液にダイゼインとTM−40株を添加し，TM−40株のin vitroにおけるヒト糞便菌叢のエコール生産性に及ぼす影響を検討した．TM-40株をエコール非産生者でジヒドロダイゼイン産生者の糞便菌叢に添加した場合，TM−40株の添加は，非添加に比べて，糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生性を向上した．しかし，エコールは検出されなかった．一方，TM−40株をエコール産生者の糞便菌叢に添加した場合，エコール産生量は増加した．TM−40株は，腸内菌叢のイソフラボン代謝を活性化する可能性がある．

クロストリジウム様腸内細菌　TM−40株はインビトロのヒトエコール産生者
及び非産生者の糞便菌叢のダイゼイン代謝に影響を及ぼす．

田村　　基，堀　　幸子，中川　博之

（独）農研機構食品総合研究所

Current Microbiology 62 (5): 1632-1637 (2011)

Lactobacillus rhamnosus JCM 2771: impact on metabolism of isoflavonoids in the fecal flora from a male equol producer.

Motoi TAMURA, Sachiko HORI, Hiroyuki NAKAGAWA

National Food Research Institute, NARO

ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771をダイジンと嫌気培養したところ，ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771はダイジンからダイゼインを産生するだけでなく，ゲニステインも産生することを見出した．しかし，ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771は，ダイゼインからはゲニステインを産生しなかった．このラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771をエコール産生者の糞便菌叢に添加して，ダイジンと嫌気培養したところ，ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771非添加の場合に比してエコール産生者の糞便菌叢のエコール産生量は増加した．ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771は，イソフラボンを代謝するとともに，エコール産生者の腸内菌叢のイソフラボン代謝に影響を及ぼす事が示唆された．

ラクトバチルス　ラムノーザス JCM 2771 がエコール産生者の糞便菌叢のイソフラボン代謝に及ぼす影響

田村　　基，堀　　幸子，中川　博之

（独）農研機構食品総合研究所

International Journal of Molecular Sciences 12 (4): 2088-2099 (2011)

Effects of New Dietary Fiber from Japanese apricot (Prunus mume Sieb. et Zucc.) on Gut Function and Intestinal Microflora in Adult Mice

Motoi TAMURA*, Yuriko OHNISHI**, Tatsuya KOTANI** and Nobuki GATO**

* National Food Research Institute, NARO
** Food Science Research Laboratory, Nakano BC Co. Ltd.

新規に製造した梅ファイバー（梅果肉乾燥粉末）の成熟マウスの消化管機能と腸内菌叢に及ぼす影響を検討した．血漿NEFA濃度は，梅ファイバー食群で低い傾向（p＝0.058）が認められた．盲腸内フローラの構成では，Bacteroides and Clostridium cluster IVの占有率が有意に高値を示した．また，糞便排泄量は，梅ファイバー食群は，コントロール食群に比べて有意に高値を示した．最終日に排泄された糞便中の総脂質含有量は，梅ファイバー食群は，コントロール食群に比べて有意に高値を示した．梅ファイバーは，糞便排泄量および脂質排泄促進作用を有していることから，新規機能性食品素材としての有用性が示唆された．

梅由来の新規食物繊維が成熟マウスの消化管機能と腸内菌叢に及ぼす影響

田村　　基*，大西由里子**，小谷　竜也**，我藤　伸樹**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 中野ＢＣ株式会社

Appetite, 58 (3), 1070-1075, (2012)

Infant visual preference for fruit enhanced by congruent in-season odor

Yuji Wada*[1], Yuna Inada*[2], Jiale Yang*[3], Satomi Kunieda*[4], Tomohiro Masuda*[1], Atsushi Kimura*[5]
So Kanazawa*[2], Masami K. Yamaguchi*[3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Japan Women's University
*[3] Chuo University
*[4] Takasago International Corporation
*[5] Tokyo Denki University

視覚・嗅覚刺激として，季節によって流通量が著しく変化するイチゴと，年間を通して流通量が比較的安定しているトマトが用いられた．生後６－８ヶ月児を対象として選好注視法を用いて検討した．その結果，イチゴの流通量が比較的多い３月から６月に実験を行なったところ，イチゴのニオイ刺激呈示時のみイチゴ画像が選好され，トマトのニオイ刺激呈示時はトマト画像が選好されなかった．イチゴの流通量が少ない７月から８月に行った実験では，イチゴ画像への選好は示されなかった．これらの現象は，生後６－８ヶ月で嗅覚情報は視覚に影響を与えることと，その連合は接触経験の影響を受けることを示唆している．

Bioscience, Biothchnology, and Biochemistry 75 (6), 1061-1066 (2011)

FXYD6, a Na,K-ATPase regulator, is expressed in type II taste cells.

Yoichiro Shindo*[1], Kana Morishita*[2], Eiichi Kotake*[2], Hirohito Miura*[3], Piero Carninci*[4], Jun Kawai*[4]
Yoshihide Hayashizaki*[4], Akihiro Hino*[2], Tomomasa Kanda*[1], Yuko Kusakabe*[2]

*[1] Asahi Breweries ltd.
*[2]National Food Research Institute, NARO
*[3] Kagoshima University
*[4] Riken

味蕾にはI，II，IIIの３種類の味細胞が含まれており，II，III型が電気的に興奮することができるが，II型とIII型細胞では性質が異なっている．この研究では，II型の細胞にナトリウムイオンの濃度を調節するNa, K-ATPaseのレギュレーターFXYD6が発現していることを見出した．In situハイブリダイゼーション法により，FXYD6は甘味，苦味，うま味の情報伝達を担い，II型の細胞に発現するTRPM5と共発現していることが明らかになった．また，FXYD6はNa, K-ATPase β1とも高い割合で共発現していた．これらの結果から，FXYD6はII型の味細胞で，ナトリウムイオンの動態の制御をしていると考えられた．

Na, K-ATPaseのレギュレーター，FXYD6はII型の味細胞に発現している

進藤洋一郎*[1]，森下　加奈*[2]，小竹　英一*[2]，三浦　裕仁*[3]，カルニンチ・ピエロ*[4]，河合　　純*[4]
林崎　良英*[4]，日野　明寛*[2]，神田　智正*[1]，日下部裕子*[2]

*[1] アサヒビール
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 鹿児島大学
*[4] 理化学研究所

Food Quality and Preference 24 (1), 213-217 (2011)

Conceptualization of food choice motives and consumption among Japanese in light of meal, gender, and age effects.

Yasushi Kyutoku*[1], Yuko Minami*[2], Takeshi Koizumi*[2], Masako Okamoto*[3], Yuko Kusakabe*[4], Ippeita Dan*[1]

*[1] Jichi Medical University
*[2] Nichirei Foods Inc.
*[3] Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
*[4] National Food Research Institute, NARO

食事の質を最適化するためには，食事の適切な選択と消費が重要である．しかしながら，食品の選択の動機の概念と，実際の消費との関係は，まだよく解っていない．そこで，本研究では，食べたいと思う，食べなければならないと思う，実際に食べている，の３つの項目を利用して，食事（朝，昼，夕食），性別，年齢が食の質の表現にどのように影響するかについて調べた．その結果，食べたい，食べなければならないという動機付けと，実際に消費するものには乖離があることが明らかになった．動機には，年齢による差はなかったが，実際に消費しているものの質については40代は低いと感じていることが明らかになた．また，これらの連関は朝食より夕食の方が強かった．

日本人の食事，性別，年齢による食の選択の動機と実際の消費の関係の概念化

久徳　康史*[1]，南　　祐子*[2]，小泉　雄史*[2]，岡本雅子*[3]，日下部裕子*[4]，檀　一平太*[1]

*[1] 自治医科大学
*[2] ニチレイフーズ
*[3] 帯広畜産大学
*[4]（独）農研機構食品総合研究所

Food Quality and Preference 24 (1), 92-98 (2012)

Package images modulate flavors in memory: Incidental learning of fruit juice flavors.

Nanami Mizutani*[1], Ippeita Dan*[2], Yasushi Kyutoku*[2], Daisuke Tsuzuki*[1], Lester Clowney*[2], Yuko Kusakabe*[3]
Masako Okamoto*[4], Toshimasa Yamanaka*[1]

*[1] University of Tsukuba
*[2] Jichi Medical University
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

果物のジュースについて，パッケージのイメージが，それに付随したフレーバーに与える効果について解析を行った．92人の被検者に対して，１：１でリンゴと桃のジュースを混合した溶液にリンゴのラベル，桃のラベル，コントロールのラベルを貼ったサンプルを味見してもらい，10分後に様々な割合でリンゴと桃のジュースを混合したものの中から，最初に味見したものに近いものを選抜してもらうという方法を採った．その結果，リンゴのパッケージのイメージがフレーバーのイメージに影響を与えることが観察された．一方，桃のイメージの効果は観察されず，理由として桃のジュースを飲む経験がリンゴよりも少ないことが考えられた．これらの結果より，フレーバーの記憶が，パッケージのイメージと飲み物の第一印象との関係を左右することが明らかになった．

容器のイメージは記憶したフレーバーの質を変化させる：果物ジュースのフレーバーにおける偶発的な学習効果

水谷奈那美*[1]，檀　一平太*[2]，久徳　康史*[2]，續木　大輔*[1]，レスター・クラウニー*[2]，日下部裕子*[3]
岡本　雅子*[4]，山中　敏正*[1]

*[1] 筑波大学
*[2] 自治医科大学
*[3]（独）農研機構食品総合研究所
*[4] 帯広畜産大学

Japanese Psychological Research, 53 (4), 440-447 (2011)

Hardness perceptions in visual penetrating motion influenced by velocity change

Tomohiro Masuda*, Atsushi Kimura**, Syo-ichi Goto*, Yuji Wada*

* National Food Research Institute, NARO
** Tokyo denki University

われわれは視覚的運動から運動対象の様々な物理的性質を知覚することができる．本研究では，貫入運動を対象として，貫入前後それぞれの速度変化（減速，等速，加速）と，貫入後の平均速度が運動対象の視覚的なかたさ判断に及ぼす影響を検討した．実験参加者（N＝11）は，貫入前後とも等速の運動を基準とした場合に，ターゲットとなる被貫入対象の表面と内部がどの程度のかたさであるかを，それぞれビジュアルアナログスケールを用いて評定した．その結果，物体表面のかたさ評定は，貫入対象が貫入前に減速，あるいは貫入後に加速する条件で高くなった．一方，内部のかたさ評定は，貫入前に等速で貫入後に減速する条件，あるいは貫入後の平均速度が貫入前よりも速い条件で低くなった．以上の結果より，貫入運動における貫入前後の各速度変化と平均速度の差が，視覚的なかたさ判断に影響を及ぼすことが示唆された．また，視覚的かたさ判断には実際の貫入運動の振る舞いには直接影響しない貫入前の速度変化までもが影響を及ぼすことが見出された．

Journal of Food Science, 76 (3), S217-224 (2011)

Conjoint Analysis on the Purchase Intent for Traditional Fermented Soy Product (Natto) among Japanese Housewives

Atsushi Kimura*[1], Shigetaka Kuwazawa*[2], Yuji Wada*[3], Yasushi Kyutoku*[4], Masako Okamoto*[5], Yui Yamaguchi*[3]
Tomohiro Masuda*[3], Ippeita Dan*[4]

*[1] Tokyo denki University
*[2] Takano Foods Co. Ltd.
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] Jichi medical university
*[5] Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine

本研究では，納豆の購買にかかわる要因をコンジョイント分析によって検討した．実験では，仮想の納豆商品を用意し，それを日本の主婦に評価させた．納豆の条件分岐として，ねばりけ，豆の原産国，たれの有無，価格，ニオイの強弱，パッケージの環境配慮が存在した．その結果，原産国，たれ，価格によって，購入意思の81％が説明できることが示された．消費者の納豆に対する好みに基づいてクラスター分析を行った結果，たれに関するセグメント，価格に関するセグメント，原産国に関するセグメントが見つかり，消費者層などは購入意思に大きな影響を与えなかった．

Protein Science 20 (10) 1720-1734 (2011)

GFP-based evaluation system of recombinant expression through the secretory pathway in insect cells
and its application to the extracellular domains of class C GPCRs.

Ashikawa Yuji*, Ihara Makoto*, Matsuura Noriko*, Fukunaga Yuko*, Kusakabe Yuko**, Yamashita Atsuko*

* Riken
** National Food Research Institute, NARO

GFPを付加したタンパク質の産生技術は，構造解析に有用な，質の良いタンパク質の量産に非常に有効である．本研究では，昆虫細胞を用いて，生産したタンパク質について，GFPを指標とした評価を行った．我々は，GFPuvが細胞質や細胞小器官，細胞外に至るまで，適切な折りたたみ構造を取っていることを検証した．その上で，Gタンパク質共役型受容体（GPCR）のクラスCの細胞膜外ドメインをこのGFPuvの評価システムに組み込み，昆虫細胞における局在，折りたたみ構造，多量体化について検討した．代謝型グルタミン酸mGluR1の膜外部位を昆虫細胞Sf9細胞に発現させたところ，多量に分泌されただけでなく，二量体を形成するなど，既報で構造解析を成功させた場合と同等の結果が得られた．一方，甘味／うま味受容体T1Rファミリーの膜外ドメインについても同様の実験を行ったところ，タンパクは細胞内に留まったままとなった．特に，mGluR1もT1rファミリーも細胞内に留まると，二量体は形成せずに凝集した形で多分散流体となっていた．これらの結果から，GPCRのクラスCの細胞膜外ドメインが適切な折りたたみ構造を取るには，分泌することが必要であると示唆された．

GFP融合技術を利用した昆虫培養細胞による組換えタンパク質分泌発現の評価系の開発と，そのGPCRクラスCの膜外領域への適用

芦川　雄二*，伊原　　誠*，松浦　紀子*，福永　優子*，日下部裕子**，山下　敦子*

* 理化学研究所
**（独）農研機構食品総合研究所

Vision Research, 51, 1728-1740 (2011)

Effects of environmental context on temporal perception bias in apparent motion

Tomohiro Masuda*[1], Atsushi Kimura*[2], Ippeita Dan*[3], Yuji Wada*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Tokyo denki University
*[3] Jichi Medical University

Kappa効果とは刺激間距離によって刺激間の時間間隔の知覚が左右される現象である．この効果は上方向の運動が近くされるときにより顕著になることが知られているが，それが網膜異方性によるのか，環境的な文脈によるのかを検証した．各刺激系列ではCGで合成した3次元空間内で仮現運動が見えるように，球の位置を変えて3回明滅させた．実験1では坂の上を移動する重力や摩擦などで再現できる範囲の球の運動（直進またはUターン），実験2では同様の平面状での球の運動，実験3，4では対象が外的あるいは内的な動力がないと不可能な運動が見える刺激系列を観察し，恒常法により，第一のISIと比較し，第二のISIの相対的な長さを判断させた．この結果，上方向の運動中の時程の課題評価は実験1でのみ見られた．この結果は，従来kappa効果の方向の効果は，単なる異方性ではなく観察された事象の文脈によって生じることを示している．

食品総合研究所研究報告，76，9-16，(2012)

苦味マスキング効果の定量的解析

河合　崇行，日下部裕子

（独）農研機構食品総合研究所

マウスは提示された試料溶液の嗜好に依存して，その溶液を舐める回数が変化する．この習性を利用して，種々の濃度の安息香酸デナトニウム苦味溶液に対する嗜好性を解析した．さらに，甘味素材であるサッカリンNa，うま味素材であるグルタミン酸Na，塩味素材である塩化ナトリウムを苦味溶液に添加した場合の嗜好性変化を検討し，変化の大きさを数値化した．その結果，2.5 mMサッカリンNaでは約44%，500 mMグルタミン酸Naでは約69%，100 mM塩化ナトリウムでは約47%苦味を弱くさせている可能性が示された．このことは，ヒト官能パネリスト試験の前段階として，実験動物を用いたマスキング効率の客観的評価が有効である可能性を示唆している．

Quantitative analysis for the masking effects to bitter taste.

Takayuki Kawai, Yuko Kusakabe

National Food Research Institute, NARO

Food Chemistry, 133, 1420-1426 (2012)

Influence of non-starch polysaccharides on the in vitro digestibility and viscosity of starch suspensions

Tomoko SASAKI and Kaoru KOHYAMA

National Food Research Institute, NARO

4種類の非澱粉性多糖類（NSP：キサンタンガム，グアガム，コンニャクグルコマンナン，ペクチン）を添加した澱粉懸濁液を調製し，添加したNSPが消化酵素による澱粉分解率と澱粉懸濁液の粘度に及ぼす影響を解析した．添加したいずれのNSPも，澱粉分解率を抑制する効果を示し，その効果には添加したNSPの濃度依存性が認められた．同じ添加濃度で比較すると，キサンタンガムは他のNSPと比較すると顕著に高い抑制効果を示した．NSPの添加により，澱粉懸濁液の粘度は増加した．澱粉分解率と見かけの粘度との関連性を解析した結果，ずり速度が低い時の見かけの粘度と澱粉分解率との間に有意な相関性が認められたが，粘度の増加だけでは澱粉分解率の抑制効果が説明できなかったため，澱粉とNSPの相互作用の関与が示唆された．

澱粉懸濁液の消化性および粘度に及ぼす非澱粉性多糖類の影響

佐々木朋子，神山かおる

（独）農研機構食品総合研究所

Food Hydrocolloids, 27, 228-234 (2011)

Complex formation, thermal properties, and in-vitro digestibility of gelatinized potato starch-fatty acid mixtures

Kiyoshi KAWAI*[1], Setsuko TAKATO*[2], Tomoko SASAKI*[3] and Kazuhito KAJIWARA*[2]

*[1] Department of Biofunctional Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima Umiversity
*[2] Department of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology
*[3] National Food Research Institute, NARO

６種類の脂肪酸（ラウリン酸，ミリスチン酸，パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸，リノール酸）を糊化させた馬鈴薯澱粉に添加し，脂肪酸の種類と量が複合体形成，澱粉の熱的性質および消化性に及ぼす影響を解析した．複合体形成の指標となるコンプレックスインデックス（CI）はラウリン酸，リノール酸，ミリスチン酸，オレイン酸，ステアリン酸，パルミチン酸の順で高い値を示した．澱粉と脂肪酸の複合体の融解エンタルピーとCI値とに間に正の相関性が認められた．澱粉消化性に及ぼす脂肪酸の影響を解析した結果，ある一定量の脂肪酸を添加した際に，消化酵素によって分解される澱粉の量が減少した．0.50 mmol/gの濃度でラウリン酸とオレイン酸を添加した際に，澱粉消化性に対する最も高い抑制効果を示した．

糊化した馬鈴薯澱粉と脂肪酸の混合物の複合体形成，熱的性質および澱粉消化性について

川井　　清*[1]，高藤勢津子*[2]，佐々木朋子*[3]，梶原　一人*[2]

*[1] 広島大学生物圏科学研究科
*[2] 東京工科大学応用生物学部
*[3] （独）農研機構食品総合研究所

International Journal of Food Properties, available online 08 Jun (2011) doi: 10.1080/10942912.2010.535186

Molecular structure and physicochemical properties of acid-methanol-treated chickpea starch

Navdeep Singh SODHI*[1, 2], Yung-Ho CHANG*[3], Sushant MIDHA*[1], Kaoru Kohyama*[2]

*[1] Department of Food Science and Technology, Guru Nanak Dev University, India
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Department of Food and Nutrition, Providence University, Taiwan

酸とアルコール（036％塩酸メタノール溶液，25℃で216時間まで）で処理したヒヨコマメ澱粉の分子構造と物理化学的性質を調べた．本処理でのヒヨコマメ澱粉の収率は82から91％であった．この酸−メタノール処理により，澱粉の膨潤性，粘性，ゲル強度は大きく減少したが，澱粉粒の形状は変わらなかった．処理中にアミロースとアミロペクチンの長鎖が分解し，物理化学的性質にも影響することがわかった．ヒヨコマメ澱粉はアミロペクチンの短鎖と長鎖の比率が低いので，酸−メタノール処理での分解が速かった．澱粉の平均分子量のデータから酸−メタノール処理したヒヨコマメ澱粉の平均分子量のデータから，分解速度を示す指数関数モデルも導かれた．

酸−メタノール処理したヒヨコ豆澱粉の分子構造と物理化学的性質

Navdeep Singh SODHI*[1, 2]，Yung-Ho CHANG*[3]，Sushant MIDHA*[1]，神山かおる*[2]

*[1] Department of Food Science and Technology, Guru Nanak Dev University, India
*[2] （独）農研機構食品総合研究所
*[3] Department of Food and Nutrition, Providence University, Taiwan

Journal of Japanese Society for Mastication Science and Health Promotion, 21 (1), 40-48 (2011)

Influence of boiling time or partial cutting food on the masticatory behavior in humans

Kouichi SHIOZAWA*[1], Kaoru KOHYAMA*[2], Nobuhiro HANADA*[3]

*[1] Department of Physiology, Tsurumi University School of Dental Medicine
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Department of Translational Research, Tsurumi University School of Dental Medicine

食べやすくするために，食物をゆでる，あるいは食物に刻み目（隠し包丁）を入れることが広く行われているが，これらの調理法がヒトの咀嚼行動に及ぼす具体的な影響についてはいまだ十分には調べられていない．そこで本研究は，健康な成人被験者に，ゆで時間の異なるブロッコリー，刻み目を入れたきゅうりとカマボコ，および刻み目を入れないきゅうりとカマボコをそれぞれ咀嚼させ，咀嚼時の咬筋筋電図と最終嚥下までの咀嚼回数を計測した．咀嚼回数の計測には咀嚼回数カウンターを用いた．ゆで時間が増すと，ブロッコリーの硬さの機器測定智は有意に減少した．また，刻み目を入れるとカマボコの硬さは有意に減少したが，きゅうりの硬さには有意な減少が認められなかった．咀嚼開始期の咬筋筋電位振幅の大きさ，および嚥下までの咀嚼回数は，摂取する咀嚼試料の硬さの程度を反映していた．本研究の結果から，摂取する食品の硬さを有意に減らす調理法をとると，咀嚼開始時の閉口筋活動や嚥下までの咀嚼回数を有意に減少させること，またきゅうりのように刻み目を入れても硬さが減少しない場合には，これらの効果は得られないことが示唆された．

食品のゆで時間，または刻み目がヒトの咀嚼行動に及ぼす影響

塩澤　光一*[1]，神山かおる*[2]，花田　信弘*[3]

*[1] 鶴見大学歯学部生理学講座
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 鶴見大学歯学部探索歯学講座

Journal of Oral Biosciences, 53 (2), 148-157 (2011)

Effects of addition of water on masticatory behavior and the mechanical properties of the food bolus

Kouichi SHIOZAWA*, Kaoru KOHYAMA**

* Department of Physiology, Tsurumi University School of Dental Medicine
** National Food Research Institute, NARO

食塊の力学的性質に及ぼす水の効果を調べるため，食塊のテクスチャー解析を行った．13名の成人被験者が 6 gのビスケットと餅を被験食品とし，水なしと 2 mlの水を加えた場合で咀嚼した．被験者には，咀嚼初期，中期，後期において食塊を吐き出させ，テクスチャープロファイルアナリシスにより，硬さ，付着性，凝集性を調べた．水を添加すると，両食品とも咀嚼回数が有意に減少した．硬さ値は咀嚼の進行に従い，両食品で，水の有無に関わらず減少した．付着性と凝集性は，ビスケット食塊では咀嚼中に増加したが，餅の食塊は水の有無に関わらず減少した．咀嚼回数は水の存在下で少なくなったが，嚥下直前の食塊のテクスチャーパラメータは，水の有無で有意差が認められなかった．以上より，水あるいは唾液が，嚥下できる状態の食塊を形成しやすくすることが示唆された．

水添加が咀嚼挙動及び食塊の力学的性質に及ぼす影響

塩澤　光一*，神山かおる**

* 鶴見大学歯学部生理学講座
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Texture Studies, 42 (4), 254-267 (2011)

Electromyography during oral processing in relation to the mechanical and sensory properties of soft gels

Sauaka ISHIHARA*[1], Makoto NAKAUMA*[1], Takahiro FUNAMI*[1], Toshie TANAKA*[2], Katsuyoshi NISHINARI*[3], Kaoru KOHYAMA*[2]

*[1] San-Ei Gen F.F.I., inc.
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Graduate School of Human Life Science, Osaka City University

軟らかいゲルを舌と硬口蓋との間での圧縮による押し潰してから自然に嚥下する際の，ゲルの力学的，感覚的性質と舌骨上筋群の筋電位（EMG）を研究した．EMGは健康な成人が摂食中に，咬筋と舌骨上筋群から記録した．ゲルの力学特性は，圧縮歪と変形速度を変えて調べた．ゲル化剤濃度が高くなると，摂食時間は延長し，舌骨上筋群EMG活動が高値となった．舌骨上筋群EMG活動は，90％等の極めて大きい歪条件下でのゲルの圧縮荷重，また官能評価による硬さと高い相関関係があった．舌骨上筋群のEMG活動は，軟らかいゲルのヒト摂食挙動を解析するのに，有効なパラメータであり，大歪条件での圧縮荷重により客観的に推測できると考えられた．

軟らかいゲルの口腔内プロセス中の筋電位と力学的，感覚的性質との関係

石原　清香*[1]，中馬　　誠*[1]，船見　孝博*[1]，田中　敏江*[2]，西成　勝好*[3]，神山かおる*[2]

*[1] 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 大阪市立大学大学院生活科学研究科

日本食品科学工学会誌，58（6），252-258（2011）

フィッシュコラーゲンペプチドがコンニャクグルコマンナン－κ－カラギーナン混合ゲルのテクスチャーに及ぼす影響

加藤　　愛*，小谷　幸敏*，島田　宏美**，佐々木朋子**，早川　文代**，神山かおる**

*（地独）鳥取県産業技術センター　食品開発研究所
**（独）農研機構食品総合研究所

一口サイズのコンニャクゼリーは，咀嚼されないで飲み込まれた場合，窒息を引き起こす危険性があるとして，幼児や高齢者に対しては不向きであるとことを示す警告，注意書きの記載が徹底されている．これは，このゲルのもつ，弾力があり，破断しにくいという力学的性質に起因している．この力学的性質を改変するため，市販のコンニャクゼリーにも利用されているコンニャクグルコマンナンとκ－カラギーナン混合ゲル（50：50）に，コラーゲンペプチドを添加した際のゲルに対する影響について，動的粘弾性，押し出し試験，咀嚼筋筋電位を測定した．その結果，フィッシュコラーゲンペプチド（低分子量，高分子量）またはゼラチンを添加すると，混合ゲルの弾性率が低下した．ゼラチンを0.8％添加した場合，体温で融解することが分かった．また，高分子量のフィッシュコラーゲンペプチドを0.8％添加した場合，咀嚼回数，咀嚼時間，筋電位振幅，総仕事量が減少した．このゲルは唯一押し出し試験により完全に2分割されたが，他の９試料は一部が破壊された．

Effects of fish collagen peptides on physical properties of mixed gels containing konjac glucomannan and kappa-carrageenan

Ai KATO*, Yukitoshi KODANI*, Hiromi SHIMADA**, Tomoko SASAKI**, Fumiyo HAYAKAWA**, Kaoru KOHYAMA**

* Tottori Institute of Industrial Technology, Food research Institute
** National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌，59（2），96-103（2012）

2バイトテクスチャー試験における測定速度条件の検討

野内　義之*，安食　雄介*，飛塚　幸喜*，佐々木朋子**，神山かおる**

* 山形県工業技術センター
**（独）農研機構食品総合研究所

テクスチャープロファイルアナリシス（TPA）での基本パラメータに測定速度が及ぼす影響を調べるため，3種類の試料を4種の市販試験機で測定した．プランジャーが試料に対し下向きと上向きに2回運動方向を変える2バイトのTPA試験を，速度10 mm/sと1 mm/sで行い，最大応力，引張時の仕事，第2バイトと第1バイトの圧縮仕事の比を異なる試験機で比較した．4機種で調べたテクスチャーパラメータの有意差は，速度条件10 mm/sでは認められたが，1 mm/sでは認められなかった．10 mm/s条件では，4機種のうち2種で設定した距離で運動方向が変わらなかった．ある測定機は，極めて長い加速時間が必要であり，仕事の測定値に影響した．またいくつかの測定機ではテクスチャーパラメータに影響するほど大きな，慣性に基づくノイズが検出された．市販の試験機で10 mm/s条件で得られたデータは，異なる機種での測定値と比較することが困難であることを示していた．

Bite-speed effects in two-bite texture analysis

Yoshiyuki NOUCHI*, Yusuke AJIKI*, Koki TOBITSUKA*, Tomoko SASAKI**, Kaoru KOHYAMA**

* Yamagata Research Institute of Technology
** National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌，58（8），359-374（2011）

日本語テクスチャー用語の対象食物名の収集と解析

早川　文代*[1]，風見由香利*[1]，井奥　加奈*[2]，阿久澤さゆり*[3]，西成　勝好*[4]，神山かおる*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 大阪教育大学
[3] 東京農業大学，[4] 大阪市立大学

これまでに，食品の研究者および技術者への質問紙調査，テクスチャー研究者への面接調査によって，日本語テクスチャー用語として445語を収集した．本研究では，445語の日本語テクスチャー用語から想起される食物名を収集し，解析した．具体的には，各用語を，テクスチャー評価に関して訓練された十分な経験のあるパネリスト18人に提示し，用語が描写する対象となりえる食物名を思いつく限り挙げさせた．データを集計したところ，テクスチャー用語から想起される935品目の網羅的なデータベースを作成することができた．次に，日本語テクスチャー用語の語彙構造を把握するために，データにコレスポンデンス分析を適用した．第1次元は破砕と流動の軸であった．第2次元は空気による軽さの軸と解釈できた．本研究で得られたデータは，記述型官能評価の候補用語源として利用でき，また，日本語テクスチャー用語の国際的な理解の有用な手掛かりとなり得る．

Collection and Analysis of Foods Associated with Japanese Texture Terms

Fumiyo Hayakawa*[1], Yukari Kazami*[1], Kana Ioku*[2], Sayuri Akuzawa*[3], Katsuyoshi Nishinari*[4] and Kaoru Kohyama*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Osaka Kyoiku University
*[3] Tokyo University of Agriculture, *[4] Osaka City University

---

Bangladesh Journal of Microbiology, Vol. 28, No. 2, pp 58-63 (2011)

Antibacterial activity of ethanol extract of betel leaf (Piper betle L.) against some food borne pathogens.

Md. Mahfuzul Hoque*, Shemona Rattila*, Md. Asaduzzaman Shishir*, Md. Latiful Bari*, Yasuhiro Inatsu**, Shinichi Kawamoto**

* University of Dhaka
** National Food Research Institute, NARO

バングラデシュのつた類植物であるキンマの葉のエタノール抽出物の食中毒菌 Vibrio cholerae ATCC 6395, E. coli ATCC 25922, E. coli O157:H7 NCTC 12049, Shigella dysenteriae-1 MJ-84 と Staphylococcus aureus ATCC 25923にたいする抗菌活性を調べた．エタノール抽出物は，これらの菌に対して抗菌活性を示し，最少増殖阻止濃度は，0.625（w/v）から0.75（w/v）の範囲であった．この抽出部の抗菌活性は，中温度域の中性pHで最大となった．また100℃或いはpH10での処理に対して，この抽出物の抗菌活性の大きな低下は認められなかった．

キンマの葉のエタノール抽出物の食中毒菌株に対する抗菌活性

M Mahfuzul Hoque*, Shemona Rattila*, M Asaduzzaman Shishir*, M L Bari*, 稲津　康弘**, 川本　伸一**

* University of Dhaka
**（独）農研機構食品総合研究所

Japan Journal of Food Microbiology, Vol. 28, No. 3, 193-200 (2011)

Biopreservation of Kamaboko (Steamed Surimi) using Piscicolin KH1 produced by Carnobacterium maltalomaticum KH1.

Kenya Hashimoto*[1], Md. Latiful Bari*[2], Yasuhiro Inatsu*[2], Shinichi Kawamoto*[2], Jun Shima*[3]

*[1] Industrial Technology Institute, Miyagi Prefectural Government
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Kyoto University

かまぼこにLeuconostoc sp. や Enterococcus sp. の乳酸菌が汚染するとネトなどを生じ，品質を低下させると共に消費期限が短くなる．これら有害菌の制御を目的に乳酸菌の生産するバクテリオシンをスクリーニングした．その結果，ニシンの腸から分離した株のCarnobacterium maltalomaticumが生産するバクテリオシンがこれらの細菌の増殖を強く阻害することが明らかとなった．ピスコリン KH1と命名したこのバクテリオシンを精製し，部分一次構造を決定したところ，ピスコリン126の配列と一致した．E. faecium とL. mesenteroidesを接種したかまぼこの10℃保存試験により，保存料として広く使用されているバクテリオシンのナイシンに比べ，ピスコリン KH1の方がこれら菌株に対してより強い増殖阻害効果を示すことが明らかとなった．

Carnobacterium maltalomaticum KH1が生産するピスコリン KH1を用いたかまぼこのバイオプリザベーション

橋本　健也*[1]，Md. Latiful Bari*[2]，稲津　康弘*[2]，川本　伸一*[2]，島　　純*[3]

*[1] 宮城県産業技術総合センター
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 京都大学

Mutation Research, 741, 95-100 (2011)

Age- and time interval-specific gamma radiation-induced DNA damage in adult maize weevils, Sitophilus zeamais Motschulsky, assessed using comet assays

Md. Mahbub Hasana*, Setsuko Todoriki**, Akihiro Miyanoshita**

* Rajshahi University
** National Food Research Institute, NARO

成虫のコクゾウムシ中でガンマ線照射により引き起こされたDNA損傷をコメットアッセイで検出した．0.5および1.0 kGyのガンマ線を用い，１日目と15日目の成虫を使用した．両方とも典型的なDNA分割を示した一方，非照射の成虫は幼虫より，より完全なDNAを示した．DNA損傷の割合は照射後24時間で増加した．

ガンマ線照射が引き起こすコクゾウムシのDNA損傷のコメットアッセイによる検出

モハメッド・M・ハッサン*，等々力節子**，宮ノ下明大**

* ラジャヒ大
**（独）農研機構食品総合研究所

食品衛生学雑誌，52，321-329（2011）

Detection of irradiated food using 2-Alkylcyclobutanones as markers:verification of the European committee standardization

Tomoaki Tutumi*, Setsuko Todoriki**, Daisuke Nei**, Takahiro Watanabe*, Rieko Matsuda*

* National Institute of Health Sciences
** National Food Research Institute, NARO

2-Alkylcyclobutanonesは食品照射による特異的放射線分解生成物で，放射線照射食品の検知に使用できる．ヨーロッパ標準規格法（EN1785）はGC/MSを使用して2-ドデシルシクロブタノンおよび2-テトラデシルシクロブタノンを検知する．この研究では単一研究所の定性試験としてEN1785を評価し，0.5 kGy以上で照射された牛肉，豚肉，鶏およびサケへ適用できることが確認された．６～９ヶ月冷凍した食物の照射も判断することが可能だった．

2-アルキルシクロブタノン類を指標にした放射線照射食品の検知：ヨーロッパ標準規格法（EN1785）の脂肪含有食品における検知性能の検証

堤　　智昭*，等々力節子**，根井　大介**，渡辺　敬浩*，松田りえ子*

* 国立医薬品食品衛生研究所
**（独）農研機構食品総合研究所

食品照射，46，1-7（2011）

PSL法による豆類の照射履歴の検知

関口　正之*1，中川　清子*1，柚木　俊二*1，大藪　淑美*1，萩原　昌司*2，等々力節子*2，多田　幹郎*3，本田　克徳*4

*1（地独）東京都立産業技術研究センター
*2（独）農研機構食品総合研究所，*3 中国学園大学
*4 日本放射線エンジニアリング株式会社

低線量を照射された豆類の照射履歴の判別について，国内に輸入される10種類の豆類（中国の大豆および小豆，斑インゲンマメ，大角豆，グリーンのグラム，カナダの青いエンドウおよび大豆，アメリカのササゲ豆およびヒヨコマメ，金時豆）を対象に，光刺激ルミネッセンス測定装置を使用して，PSL積算発光量の経時変化と線量応答，校正PSL測定によるPSL発光比による検討を行った．照射した豆類のPSL積算発光量は時間とともに緩やかに減少したが，0.5 kGy照射し３～６ヶ月保存したものでもPSL測定の上限閾値を大きく上回り照射履歴の判定ができた．カナダ産青エンドウと大豆は未照射にもかかわらずPSLが下限閾値（700 counts）を越えたが，PSL発光比で再評価し「未照射」と正しく判定できた．豆類のPSL発光比の経時変化と線量応答性の情報を蓄積することにより，照射された線量を推定できる可能性があった．

Detection of Irradiated Pulses by PSL Method

Sekiguchi Masayuki*1, Nakagawa Seiko*1, Yunoki Shunji*1, Ohyabu Toshimi*1, Hagiwara Shoji*2
Todoriki Setsuko*2, Tada Mikirou*3, Honda Katsunori*4

*1 Tokyo Metropolitan Industrial Research Institute
*2 National Food Research Institute, NARO, *3 Chugoku Gakuen University
*4 Japan Radiation Engineering Co, Ltd.,

食品照射，46，19-23（2011）

PSL法によるエビの照射履歴の検知

陳　　蘇蘇*,**，齊藤希巳江**，萩原　昌司**，中嶋　光敏*，等々力節子**

* 筑波大学
**（独）農研機構食品総合研究所

産地や種類の異なる5種類のエビ背腸の内容物について，国産PSLシステムで光ルミネッセンス測定を行った．その結果，非照射試料のPSL積算発光量は下限しきい値（T1＝1000 counts/90 s）を下まわり，一方，1 kGy照射した試料は全て上限しきい値（T2＝4000 counts/90 s）を超えることが確認された．また，LEDによる光照射前後の発光量の増加とPSL発光の減少を評価パラメータとして用いても，非照射と1 kGy照射の試料との間に明確な差が確認された．したがって，本PSL法はスクリーニング方法としてエビの照射履歴を検知することができる．

Detection of Irradiated prawns by Photostimulated Luminescence

Susu Chen*, **, Kimie Saito**, Shoji Hagiwara**, Mitsutoshi Nakajima*, Setsuko Todoriki**

* Univercity of Tsukuba
** National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌，58(9)，464-469（2011）

NaI（Tl）シンチレーションサーベイメータによる穀物試料の放射性セシウム測定
－環境放射線の遮へい効果とGe半導体検出器測定との相関－

亀谷　宏美*，萩原　昌司*，根井　大介*，柿原　芳輝**，木村啓太郎*，松倉　　潮*，川本　伸一*，等々力節子*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 財団法人日本穀物検定協会

福島第一原子力発電所の事故後の環境放射線量の条件で食品中の放射性セシウムをNaI（Tl）シンチレーションサーベイメータで検出ために有効な遮へい条件を検討した．つくば市内を例に取り，環境放射線の遮へいによる低減効果を示した．また，大麦試料中の放射能の検出に有効な遮へい条件と測定ジオメトリを設計し，適切な遮へい条件下でNaI（Tl）シンチレーションサーベイメータで計測した正味計数率とGe半導体検出器による放射性セシウム濃度とに良好な直線的相関があることを検証した．

The shielding of radiation for the detection of radioactive cesium in cereal　sample by using a NaI (TI) scintillation survey meter

Hiromi Kameya*, Shoji Hagiwara*, Daisuke Nei*, Yoshiteru Kakihara**, Keitaro Kimura*, Ushio Matsukura*
Schinichi Kawamoto*, Setsuko Todoriki*

* National Food Research Institute, NARO
** The Japan Grain Inspection Association

Applied Magnetic Resonance, 40 (3), 395-404 (2011)

Electron spin resonance (ESR) spectroscopy of gamma irradiated glucose polymers

Hiromi Kameya*1, Hideo Nakamura*2, Mitsuko Ukai*2, Yuhei Shimoyama*3

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 Hokkaido University of Education
*3 Japan Atomic Energy Agency

ガンマ線による殺菌処理は食品や生薬の香りや味，薬効を損なうことなくシェルライフを伸ばす．さらに，有害な微生物や寄生虫への不妊や殺虫に有効であり，害虫が付着した野菜や果物が輸出入されないよう防疫を目的とした食品への照射も行われている．著者らは植物性食品に照射することで誘導されるラジカルについて報告してきた．植物性照射食品では２種のESR信号が観測されてきた．１種は g = 2.0近傍の１本線信号，もう１種は１本線信号に対称の位置に観測されるサイド信号である．１本線信号はセミキノンラジカルなどの有機フリーラジカルに由来する信号である．サイド信号は，照射コショウ，朝鮮人参で観測したことを報告している．また，セルロースやデンプンを含有する小麦粉では，照射コショウで観測されたサイド信号と類似しているが，より複雑な信号が観測された．

ガンマ線照射グルコースポリマーの電子スピン共鳴解析

亀谷　宏美*1，中村　秀夫*2，鵜飼　光子*2，下山　雄平*3

*1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 北海道教育大学
*3 日本原子力研究開発機構

Applied Magnetic Resonance, 42 (2), 153-159 (2011)

Relaxation behaviors of free radicals from gamma-irradiated black pepper using pulsed EPR spectroscopy

Hiromi Kameya*1, Masahiro Kikuchi*2, Hideyuki Hara*3, Masakazu Furuta*4, Setsuko Todoriki*1
Yasuhiko Kobayashi*2, Mitsuko Ukai*5, Yuhei Shimoyama*2

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 Japan Atomic Energy Agency
*3 Bruker BioSpin K. K.
*4 Osaka Prefecture University
*5 Hokkaido University of Education

Pulse-ESR と CW-ESR による照射黒コショウ中のラジカルの計測を試みた．Pulse-ESR と CW-ESR から得られた緩和時間（T1，T2）の比較を行った．pulse-ESR の実測値，CW-ESR による計算値ともに，T1，T2を求めることができた．緩和時間はT1の値は照射処理による変化が少なかった．T2の値は，照射によって増大した．Pulse-ESR 実測値と CW-ESR 計算値（T1，T2）は同様の傾向を示すことがわかった．

パルスEPR分光器を用いたガンマ線照射黒胡椒中のフリーラジカルの緩和挙動

亀谷　宏美*1，菊地　正博*2，原　　英之*3，古田　正和*4，等々力節子*1，小林　泰彦*2，鵜飼　光子*5，下山　雄平*2

*1 (独) 農研機構食品総合研究所
*2 日本原子力研究開発機構
*3 ブルッカーバイオスピン株式会社
*4 大阪大学
*5 北海道教育大学

Food Additives and Contaminants Part A 28 (10), 1447-1456 (2011)

Detection of new Fusarium masked mycotoxin in wheat grain by high-resolution LC-Orbitrap MS

Hiroyuki NAKAGAWA*[1], Kimihide OHMICHI*[2], Shigeru SAKAMOTO*[2], Yuki SAGO*[1], Masayo KUSHIRO*[1]
Hitoshi NAGASHIMA*[1], Megumi YOSHIDA*[3], Takashi NAKAJIMA*[3]

*[1] National Food Research Institute, NARO, *[2] Thermo Fisher Scientific
*[3] National Agricultral Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

新規Fusariumマイコトキシンの配糖体，fusarenon X-glucoside（FUXGlc）がFusarium属糸状菌を感染させた麦粒中に存在することが初めて報告された．この新規配糖体は高分解能LC-Orbitrap 質量分析装置（LC-Orbitrap MS）を用い，特徴的なイオンの精密質量とMS/MSフラグメントパターンに基づいて同定された．FUXGlcの構造はLC-MSでは完全には明らかにはされなかったが，フラグメントの特徴や構造が類似しているかび毒であるdeoxynivalenol（DON）の糖誘導体としてdeoxynivalenol-3-glucoside（DON3Glc）が有意に存在することを考慮して，3-OH基におけるグルコシル化が最も可能性が高い構造であると思われた．別のかび毒配糖体である，nivalenol-glucoside（NIVGlc）も同じ麦粒内において発見された．LC-Orbitrap MSを用いた半定量分析により，15%以上のFUXやNIVがそれぞれのグルコシド体に変換されていると推定された．これらの新規マスクドマイコトキシンの存在はリスク評価の際に考慮されるべきである，というのはこれらの配糖体は特定の条件，例えば各種の食品加工工程や哺乳類による摂食後の消化器官内において加水分解されて元のかび毒に戻る可能性があるためである．

高分解能LC-Orbitrap MSによる麦粒中に含まれる新規Fusariumマスクドマイコトキシンの検出

中川　博之*[1]，大道　公秀*[2]，坂本　　茂*[2]，佐合　由紀*[1]，久城　真代*[1]，長嶋　　等*[1]，吉田めぐみ*[3]，中島　　隆*[3]

[1]（独）農研機構食品総合研究所，[2] サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）
*[3]（独）農研機構　九州沖縄農業研究センター

Japan Agricultural Research Quarterly 45, 441-444 (2011)

Geldanamycin, an Inhibitor of Heat Shock Protein 90, Mitigates Nivalenol-caused Changes in Cytokine Secretion in HL60 Cells

Hitoshi NAGASHIMA, Hiroyuki NAKAGAWA, Masayo KUSHIRO

National Food Research Institute, NARO

ニバレノール（NIV）の毒性発現機構解明のため，熱ショックタンパク質90（Hsp90）のヒト白血病細胞HL60におけるNIVの細胞毒性への関与を，Hsp90の特異的阻害剤ゲルダナマイシン（GA）を用いて検討した．測定は24時間処理後に行った．NIVは顕著にインターロイキン（IL）-8の分泌を誘導したが，GAによる変化はわずかだった．両薬剤で同時処理後の分泌量はNIV単独処理より顕著に少ないことから，NIV誘導性のIL-8分泌にはHsp90が重要であると考えられた．NIVとGAは，単独で単球走化性タンパク質（MCP）-1の分泌を減少させた．GA処理の有無にかかわらず，NIV処理した試料の値はほとんど同じだった．統計的解析からGAはMCP-1分泌へのNIVの影響を緩和していると考えられた．NIVが細胞増殖を顕著に阻害したのに対し，GAの効果は穏やかだった．両薬剤による同時処理の値はNIV単独処理より低かった．このことはGAはNIVによる細胞増殖阻害を防がないことを意味している．この研究でHsp90のNIVによるサイトカイン分泌変化への関与を示した．しかしNIVによる細胞増殖阻害へのHsp90の関与は可能性が低いと考えられた．

熱ショックタンパク質90の阻害剤ゲルダナマイシンはニバレノールによって起こるHL60細胞のサイトカイン分泌の変化を緩和する

長嶋　　等，中川　博之，久城　真代

（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Materials Science and Engineering B, 1, 347-351 (2011)

New ESR detection method of hydroxyl radical scavenging activity of blue berry

Hiromi Kameya*, Mitsuko Ukai**

* National Food Research Institute, NARO
** Hokkaido University of Education

電子スピン共鳴（ESR）分光学を使用したブルーベリーのヒドロキシルラジカル捕捉能の新たな評価法を報告した．ヒドロキシルラジカル捕捉能は5-(2,2-dimethy-1,3-propoxycyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide（CYPMPO）という無色結晶で水溶性の高い新しいスピントラップ剤を用いて計測した．計測法は，Hg-Xeランプにより，過酸化水素とCYPMPOを含有するリン酸緩衝液を照射する．この手法は非常に純粋なヒドロキシルラジカルを生成した．また，観測されるアダクトも非常に安定しており，ブルーベリーのヒドロキシルラジカル捕捉能を評価するのに非常にふさわしい計測方法を開発した．

ブルーベリーのヒドロキシルラジカル捕捉能の新しいESR検知方法

亀谷　宏美*，鵜飼　光子**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 北海道教育大学

Mycopathologia 172 (4), 323-330 (2011)

Distinct distribution of deoxynivalenol, nivalenol, and ergosterol in Fusarium-infected Japanese soft red winter wheat milling fractions

Manasikan THAMMAWONG*, Hiroshi OKADOME*, Takeo SHIINA*, Hiroyuki NAKAGAWA*
Hitoshi NAGASHIMA*, Takashi NAKAJIMA**, Masayo KUSHIRO*

* National Food Research Institute, NARO
** National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

かび毒による穀類の汚染とかび毒の最終食品での残存は食品安全上大きな問題である．以前われわれは，国産軟質冬小麦に含まれるデオキシニバレノールとニバレノール量の製粉での動態を解析し，両毒素がヒトの可食部となる粉分画にも分布することを見出した．本研究では，菌体量の指標となるエルゴステロールの製粉分画（上質粉，末粉，大フスマ，小フスマ）での分析法の試験室内妥当性確認を行い，各分画中エルゴステロール量を定量し，両毒素の蓄積量と菌の穀粒内部への侵入との関連を調べた．汚染レベルが異なる穀粒を製粉した結果，エルゴステロール濃度はいずれも上質粉で最も低く，フスマで最も高かったことから，高汚染粒においても菌の大部分は穀粒の外皮に留まっていることが示された．両毒素濃度は上質粉・末粉ともに，汚染レベルが中程度以上の試料では，原粒での濃度よりわずかに低いのみであった．エルゴステロールの分布度は汚染レベルに関わらず大フスマで最も高かったが，両毒素は異なる分布度を示した．以上より，両毒素の穀粒内部での拡散が，菌の侵入とは独立して起こっていることが示された．

フザリウム属菌に感染した国産軟質冬小麦中デオキシニバレノール，ニバレノールと
エルゴステロールの製粉分画における分布度の違い

Manasikan Thammawong*，岡留　博司*，椎名　武夫*，中川　博之*，長嶋　　等*，中島　　隆**，久城　真代*

*（独）農研機構食品総合研究所
**（独）農研機構九州沖縄農業研究センター

Mycotoxins 61 (2), 47-52 (2011)

Fumonisin B2 production on agar media by Aspergillus niger of Japanese origin

Masayo KUSHIRO, Hiroyuki NAKAGAWA, Hitoshi NAGASHIMA, Michihiko SAITO

National Food Research Institute, NARO

Aspergillus nigerは産業微生物として重要な糸状菌の一種である．近年，典型的Fusarium属菌産生マイコトキシンとされるフモニシンB2が，A. nigerによって産生されたという報告が諸外国から出されている．しかし，これまでに日本国内で分離されたA. nigerについてフモニシンB2産生性を調査した報告はない．今回われわれは，国内で分離されたA. nigerの７菌株についてフモニシンB2の産生性を解析した．菌株を各種寒天培地で培養後，菌体を含む培地全体を収穫し，AOAC995.15法に準じた方法でフモニシンの産生性を調査した．その結果，調査に供した７株中１株がフモニシンB2産生陽性であり，その産生性には培地の組成依存性が認められた．

国内分離Aspergillus niger菌株の各種寒天培地でのフモニシン産生

久城　真代，中川　博之，長嶋　　等，斉藤　道彦

（独）農研機構食品総合研究所

Radiation Physics and Chemistry, 81, 316-321 (2011)

Assessment of gamma ray-induced DNA damage in Lasioderma serricorne using the comet assay

Hiromi Kameya, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Setsuko Todoriki

National Food Research Institute, NARO

害虫の照射処理を確認するためにアルカリ性条件の下のDNAコメットアッセイ分析を試みた．Lasioderma serricorneにコバルト60から１kGyのガンマ線照射を行った．照射直後から７日間，時間経過とともにコメットアッセイを行った．その結果，Ratio値は照射の有無の判別に使用できることを提案し，アルカリ性条件のもとでのDNAコメットアッセイ分析は照射履歴の識別に利用可能であると結論した．

コメットアッセイを用いたLasioderma serricorneのガンマ線照射により引き起こされるDNA損傷の評価

亀谷　宏美，宮ノ下明広，今村　太郎，等々力節子

（独）農研機構食品総合研究所

Radioisotopes, 60 (4), 173-180 (2011)

ESR Analysis of Irradiated Red Peppers and Commercial Red Peppers in Japan

Hiromi Kameya*, Mitsuko Ukai**

* National Food Research Institute, NARO
** Hokkaido University of Education

放射線照射唐辛子と，加工処理の異なる市販唐辛子をESRで解析した．加工処理は天日干し，機械的加工処理（加熱殺菌，粉末化など）である．一定量の試料で計測した．唐辛子のESRスペクトルはg＝2.00の鋭い１本線信号が検出された．これは有機フリーラジカル由来の信号と考えられる．加熱処理のラジカル生成への関与は必ずしも大きくないと考えた．粉末化処理は唐辛子のラジカル生成に大きく関与していると考えた．放射線照射処理した試料ではESR信号強度は照射量が増すに従い増大した．粉末試料の信号強度と照射処理試料の信号強度とはほぼ同じ値を示した．放射線照射試料と非照射試料の緩和挙動と緩和時間（T1，T2）には差異があった．照射試料の緩和時間は非照射試料と比較し，T1は増え，T2は減少した．唐辛子は加工処理のうち，放射線照射処理と粉末化処理によるラジカル生成の影響が大きいことが分かった．

国内の市販唐辛子と放射線処理唐辛子のESRによるラジカル解析

亀谷　宏美*，鵜飼　光子**

*1（独）農研機構食品総合研究所
*2 北海道教育大学

Report of National Food Research Institute 76, 29-32 (2012)

Comparison of anti-proliferative effects of trichothecene mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol in cultured cells

Hitoshi NAGASHIMA, Masayo KUSHIRO, Hiroyuki NAKAGAWA, Keiko IWASHITA

National Food Research Institute, NARO

ニバレノール（NIV）とデオキシニバレノール（DON）の毒性発現機構を解明するために，培養細胞の増殖に対する両毒素の阻害効果を検討した．毒素処理24時間後に試験を行った．両毒素は試験に供した４つの培養細胞の増殖を遅らせた．ヒト前骨髄球白血病細胞HL60とヒトリンパ芽球白血病細胞MOLT-4，ラット大動脈筋芽細胞A-10においては，DONよりもNIVの方が効果が強かった．これに対し，ヒト肝芽腫細胞HepG2では両毒素ともほぼ同じ効果を示した．もし両毒素が同一の毒性発現機構で毒性を発揮しているのであれば，細胞の種類にかかわらずDONとNIVの50％阻害濃度（IC50）の比は一定になると考えられるが，各々の細胞のIC50の比は一様でないことから，両毒素の毒性発現機構には違いがあると考えられた．

培養細胞におけるトリコテセン系マイコトキシンのニバレノールとデオキシニバレノールの細胞増殖阻害活性の比較

長嶋　　等，久城　真代，中川　博之，岩下　恵子

（独）農研機構食品総合研究所

Toxicology Letters 206, 238-243 (2011)

Rubratoxin B induces signs of fatty acid oxidation disorders (FAODs) in mice

Keiko IWASHITA, Hitoshi NAGASHIMA

National Food Research Institute, NARO

ルブラトキシンＢ（RB）は低血糖と脂肪肝を起こすカビ毒である．血糖値は肝グリコーゲンの貯蔵状態と関連するので，RBが肝グリコーゲン量とその制御に与える影響を検討した．マウスはRBで24時間処理した．処理マウスの胃は極端に膨らんでおり，内容物は対照群より顕著に重かった．低血糖は食欲を亢進させるので，RBは満腹を感じにくくしているのかもしれない．RBは肝グリコーゲンを枯渇させた．処理マウス肝臓のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）活性及びそのmRNA量は減少していた．このことはRBのPEPCK活性阻害が肝グリコーゲンを枯渇していることを示している．PEPCK活性とmRNA量は同程度に減少していたのでPEPCK活性は転写レベルで制御されていると考えられた．処理群の肝臓ではPEPCK遺伝子の転写活性化因子が顕著に減少していたので，これらがPEPCK遺伝子の転写に重要であることを示している．RB中毒症と脂肪酸酸化異常症（FAOD）は特徴的な症状を共有している．FAODは遺伝病であるが，我々の結果は化学物質によってもFAOD様の症状が起こされることを示している．

ルブラトキシンＢはマウスに脂肪酸酸化異常症（FAOD）の症状を誘導する

岩下　恵子，長嶋　　等

（独）農研機構食品総合研究所

食品照射，46（1），13-18（2011）

照射食品に誘導されるラジカルの減衰挙動

貝森　良彦*1，坂本　侑輝*1，菊地　正博*2，亀谷　宏美*3，中村　秀夫*1，下山　雄平*2，小林　泰彦*2，鵜飼　光子*1

*1 北海道教育大学，*2 日本原子力研究開発機構
*3（独）農研機構食品総合研究所

黒コショウ，コーヒー生豆及び朝鮮人参にγ線を照射し，照射直後のESR信号強度の減衰を観測した．照射直後にラジカル信号が観測され，時間の経過につれてラジカル減衰した．g値約2.00の１本線信号の強度は，吸収線量の増加につれて増加した．ESR信号強度の減衰挙動から，異なる半減期を持つ２つ以上のラジカルの存在が示唆された．照射された試料は類似した減衰挙動を示したが，信号強度は黒コショウが高かった．

Initial Decay Process of Radicals Induced in Irradiated Food

Yoshihiko Kaimori*1, Yuki Sakamoto*1, Masahiro Kikuchi*2, Hiromi Kameya*3, Hideo Nakamura*1
Yuhei Shimoyama*2, Yasuhiko Kobayashi*2, Mistuko Ukai*1

*1 Hokkaido University of Education
*2 Japan Atomic Energy Agency
*3 National Food Research Institute, NARO

Food Science and Technology Research, 17, 479-483 (2011)

Effectiveness of stable ozone microbubble water on reducing bacteria on the surface of selected leafy vegetables

Yasuhiro Inatsu*, Tomoko Kitagawa*, Nobutaka Nakamura*, Susumu Kawasaki*, Daisuke Nei*, Md Latiful Bari**, Shinichi Kawamoto*

* National Food Research Institute, NARO
** University of Dhaka

殺菌剤としてマイクロバブルオゾン水処理による効果をin vitroで13種類の微生物を用いて評価した．さらに浸漬法により汚染させた大腸菌O157: H7および４種類の自然汚染された葉物野菜を用いて評価した．比較として，オゾンガス・次亜塩素酸ナトリウム水溶液・蒸留水で処理した際の影響も調べた．in vitro系での実験では5.0～7.4 logの一般生菌数の減少が観察された．一方４種類の葉物野菜において，大腸菌数はマイクロバブルオゾン水では0.8～1.2，次亜塩素酸ナトリウム水溶液では0.9～1.8 log CFU/gの減少が観察された．マイクロバブルオゾン水・オゾン水・蒸留水による処理での明確な差は認められず，さらにオゾンガスに葉物野菜を曝露した際の生菌数の減少は観察されなかった．自然汚染の系についても同様の結果を得た．色調・外観の変化は，蒸留水で処理した場合との違いは見られなかった．葉物野菜表面におけるマイクロバブルオゾン水の殺菌効果はオゾン水と同等と考えられた．

葉物野菜表面付着微生物殺菌におけるマイクロバブルオゾン水の効果

稲津　康弘*，北川　智子*，中村　宣貴*，川崎　　晋*，根井　大介*，Md Latiful Bari**，川本　伸一*

*（独）農研機構食品総合研究所
** ダッカ大学

Foodborne Pathogens and Disease 8 (10), 1089-1094 (2011)

Disinfection of Radish and Alfalfa Seeds Inoculated with Escherichia coli O157:H7 and Salmonella by a Gaseous Acetic Acid Treatment

Daisuke Nei*1, Bari, M. Latiful*2, Katsuyoshi Enomoto*3, Yasuhiro Inatsu*1, Shinichi Kawamoto*1

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 University of Dhaka
*3 Daisey Machinery Co. Ltd.

酢酸ガスを8.7％の濃度で2-3時間処理することにより，アルファルファ種子およびカイワレ種子に接種した大腸菌O157: H7およびサルモネラの生菌数を5 log CFU/g以上低下させることができた．また，酢酸ガスを48時間処理することにより，大腸菌O157: H7を完全に死滅させることが可能であった．ガス処理にともなう発芽率の低下は認められなかった．

酢酸ガスによるカイワレ種子およびアルファルファ種子に接種した病原菌の殺菌

根井　大介*1，モハメド・ラティフル・バリ*2，榎本　克義*3，稲津　康弘*1，川本　伸一*1

*1（独）農研機構食品総合研究所
*2 ダッカ大学
*3（株）大生機械

Journal of AOAC International, 94, 857-862 (2011)

Evaluation of TA10 broth for recovery of heat- and freeze-injured Salmonella from beef

Naoko Kamisaki-Horikoshi*[1], Yukio Okada*[1], Kazuko Takeshita*[1], Takashi Sameshima*[1], Susumu Kawasaki*[2]
Shinichi Kawamoto*[2], Pina M. Fratamico*[3]

*[1] Prima Meat Packers Ltd.
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] USDA/ERRC

BAMで認められているSalmonellaの前培養培地であるLactose（LAC）broth, Buffered Peptone water（BPW），Universal Pre-enrichment（UP）brothと開発培地TA10 brothを用いて，加熱および凍結損傷させたSalmonellaの牛挽肉中からの検出率を比較した．汚染レベルは加熱区では0.44～<0.001および凍結区では0.44～0.14 MPN/gとなるように設定し，各25 gのサンプル20個をそれぞれの培地に供し，検出率を培養法で比較した．加熱損傷区ではTA10とLAC brothでは189（67.5%）対156（55.7%）の陽性数が得られ，検出率に有意差（$\chi 2 = 7.73$）を認めた．凍結損傷区においては，TA10とLAC brothでは189（72.7%）対133（51.2%）の陽性数が得られ，検出率に有意差（$\chi 2 = 24.7$）を認めた．損傷Salmonellaでは，TA10はLACおよびUPよりも効果的な回復を示したことから，TA10はLACよりも，加熱および凍結損傷したSalmonellaに汚染された牛挽肉からの検出率を高めると考えられた．

加熱および凍結損傷させたSalmonellaの牛挽肉中を用いたTA10 Brothの回復率評価

上崎（堀越）菜穂子*[1]，岡田　幸男*[1]，竹下　和子*[1]，鮫島　　隆*[1]，川崎　　晋*[2]，川本　伸一*[2]，Pina M. Fratamico*[3]

*[1] プリマハム基礎研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] USDA/ERRC

食品衛生学雑誌，52（2），108-111，（2011）

新規液体食品用容器 PID（Pouch in Dispenser）の微生物に対する保護特性の検討

富成　啓太*[1]，田中　朝土*[1]，篠田　裕馬*[2]，二瀬　克規*[2]，根井　大介*[3]，一色　賢司*[1]

*[1] 北海道大学大学院
*[2] 株式会社悠心
*[3]（独）農研機構食品総合研究所

液体食品用容器PID（Pouch in Dispenser）の通常使用時，および人為的汚染時における内容物保護特性の検討を行った．開封後，静置あるいは風を当てた場合，ならびに内容物を注ぎ出した場合も，PIDへの菌の侵入は確認されなかった．人為的に菌液を注ぎ口に塗布した場合，供試菌が内部に侵入した．乾燥させた布を用いて供試菌を塗布した場合，内部への侵入が確認されなかったことから，清潔な乾燥した布で注ぎ口をふいた場合は微生物が侵入する可能性は低いと考えられた．注ぎ口に触れない注意喚起表示や，内容物によっては水分活性，pH等の調整，保存料の使用が必要であると考えられた．

Food Protective Property of New Liquid Food Container PID (Pouch in Dispenser) for Microbes

Keita Tominari*[1], Asato Tanaka*[1], Yuma Shinoda*[2], Katsunori Futase*[2], Daisuke Nei*[3], Kenji Isshiki*[1]

*[1] Hokkaido University
*[2] Yushin Industries, Ltd.
*[3] National Food Research Institute, NARO

日本食品微生物学会雑誌，28，219-225（2011）

果物・野菜における食中毒菌多重検出キット“［TA10］Pathogenic Bacterial Multiplex PCR Detection System”の評価と前培養条件の検討

川崎　晋*[1]，鄒　碧珍*[2]，難波　豊彦*[2]，有馬　和英*[2]，木内勲*[3]，上﨑（堀越）菜穂子*[4]，川本　伸一*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 財団法人　東京顕微鏡院
*[3] 株式会社　ドール
*[4] プリマハム　株式会社

食中毒菌多重検出システム“［TA10］Pathogenic 24 Bacterial Multiplex PCR Detection System”を用いて，果物・野菜からの検出法について評価した．16種類の果物・野菜を上記キットに供したところ，いずれも35±1℃，22時間培養後の前培養液 1 ml から Multiplex PCR 法で検出可能であった．しかしながら，pH の低い試料では増菌時での増殖への影響が示唆されたため，増菌培地間の比較と試料液の中和操作を行った場合での培養改善効果について検討した．その結果，試料液の事前の中和操作よりもむしろ夾雑微生物の増殖により引き起こされる培地 pH 低下の緩和が重要である可能性を示唆した．前培養培地の pH 緩衝能は，上記の遺伝子検査法や培養法での検出において検討すべき重要な因子となりうる．

Evaluation of detection sensitivity and pre-enrichment efficacy of [TA10] pathogenic bacterial multiplex PCR detection system kit in fruit and vegetable food samples.

Susumu KAWASAKI*[1], Bizhen ZOU*[2], Toyohiko NAMBA*[2], Kazuhide ARIMA*[2], Isao KIUCHI*[3]
Naoko KAMISAKI-HORIKOSHI*[4] and Shinichi KAWAMOTO*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Tokyo Kenbikyoin Foundation
*[3] Dole Japan Ltd.
*[4] Prima Meat Packers Ltd.

ペストロジー　26（2）：53-57（2011）

チョコレート製品でのノシメマダラメイガ Plodia interpunctella 幼虫の発育

宮ノ下明大，今村　太郎

（独）農研機構食品総合研究所

チョコレート製品でのノシメマダラメイガ幼虫の発育を調べた．ミルクチョコレートでの成虫羽化率は25℃で８％，30℃で22％と低く，発育日数は25℃で140日以上，30℃で88日以上であった．これらの結果より，ノシメマダラメイガ幼虫にとってチョコレート製品は適した食物ではないと考えられた．アーモンドを含むミルクチョコレート製品では，アーモンドを含まないものに比べて短い発育日数（約69日／25℃・約52日／30℃）と高い成虫羽化率（50％／25℃・53％／30℃），思い成虫体重を示した．

Larval development of the Indian meal moth, Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae), on chocolate products.

Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura

National Food Research Institute, NARO

食品照射，46，24-26（2011）

繭の中のタバコシバンムシに対する低エネルギー電子線の効果

今村　太郎，宮ノ下明大，等々力節子

（独）農研機構食品総合研究所

低エネルギー電子線は食品を外側から加害する昆虫には高い殺虫力を持つが，穀物などの粒の中で発育するものに対しては完全な殺虫は難しい．タバコシバンムシはその生活環におけるどのステージにおいても食品を外側から加害する性質を持つものの，後期の幼虫は繭を作り，その中で蛹化する．よってこの繭が電子線を遮る効果があるかを確かめるために，エネルギーの異なる電子線を繭ごとタバコシバンムシに照射し，その生死を観察した．加速電圧80 kVでは全く生存率に変化はなく，150 kVでは少数が生存した．

Effect of Low-Energy Electrons on the Cigarette Beetles Inside the Cocoons

Imamura Taro, Miyanoshita Akihiro, Todoriki Setsuko

National Food Research Institute, NARO

Canadian Journal of Plant Pathology 33 (3) 347–354 (2011)

Identification and activity of a phytotoxin produced by Calonectria ilicicola, the causal agent of soybean red crown rot

Sunao OCHI*[1], Mitsuru YOSHIDA*[2], Akio NAKAGAWA*[1], Masahiro NATSUME*[3]

*[1] National Agricultural Research Center, NARO
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

ダイズ黒根腐病菌Calonectria ilicicolaの生産する植物毒素として，４種類のアミノ酸から成る環状ペプチドPF1070Aを単離した．本化合物は，抗腫瘍性抗生物質として報告があり，マウスのLtk-細胞にメタロチオネインの合成を誘導する．黒根腐病菌へ感受性の異なる３種類のダイズ品種をPF1070Aで処理した結果，品種間差は認められなかった．一方，黒根腐病菌17菌株におけるPF1070A生産量を調べたところ，病原性の強さとPF1070A生産量には強い正の相関があることが明らかになった．以上のことから，植物毒素PF1070Aはダイズ黒根腐病菌の病原性発現に関与していることが示唆された．

ダイズ黒根腐病菌Calonectria ilicicolaの生産する植物毒素の同定と活性

越智　　直*[1]，吉田　　充*[2]，仲川　晃生*[1]，夏目　雅裕*[3]

*[1]（独）農研機構中央農業総合研究センター
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 東京農工大学応用生物科学科

Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (17) 9581–9587 (2011)

Isolation and identification of flavonoids accumulated in proanthocyanidin-free barley

Hiroshi NAKANO*[1], Naoyuki KAWADA*[1], Mitsuru YOSHIDA*[2], Hiroshi ONO*[2], Rika IWAURA*[2], Takuji TONOOKA*[3]

*[1] National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] National Institute of Crop Science, NARO

大麦品種ニシノホシのプロアントシアニジン非含有準同質遺伝子系統であるiso ant 13，iso ant 17，iso ant 12に蓄積されるフラボノイドを調べたところ，tricinや新規フラボノイド（2RS）-dihydrotricin 7-O-β-D-glucopyranosideを含む７種類のフラボノイドが同定された．これらのフラボノイドの濃度は上記３系統でほぼ同レベルであったが，tricin以外はニシノホシやあまぎ二条，Harringtonのような栽培品種には検出されなかった．ニシノホシにおけるtricinの含量は，ニシノホシのiso ant 13，iso ant 17，iso ant 12における含量の半部であった．Tricinとその前駆体であるdihydrotricinやそのグルコシドであるdihydrotricin 7-O-β-D-glucopyranoside，chrysoeriolやhomoeriodictyolのニシノホシのiso ant 13, iso ant 17, and iso ant 22における蓄積は，プロシアニジン合成におけるflavanone 3-hydroxylaseの阻害によるプロシアニジン前駆体の他の生合成系への利用の増加によるものと推測された．

プロアントシアニジン非含有大麦に蓄積するフラボノイド類の単離と同定

中野　　洋*[1]，河田　尚之*[1]，吉田　　充*[2]，小野　裕嗣*[2]，岩浦　里愛*[2]，塔野岡卓司*[3]

*[1]（独）農研機構九州沖縄農業研究センター
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3]（独）農研機構作物研究所

日本食品科学工学会誌，58（11），525-530（2011）

日本における炊飯米由来のアクリルアミド摂取量評価

吉田　充[*1]，三好　恵子[*2]，堀端　薫[*3]，水上　裕造[*4]，竹中真紀子[*1]，安井　明美[*1]

[*1]（独）農研機構食品総合研究所
[*2] 女子栄養大学短期大学部
[*3] 女子栄養大学
[*4]（独）農研機構野菜茶業研究所

日本人の主食である炊飯米からのアクリルアミド摂取寄与を推定するために，炊飯米に関して臭素化誘導体化GCMS法による低濃度での定量分析法を確立し，アクリルアミドの測定を行った．２種類の家庭用炊飯装置および業務用炊飯装置の１機種を用いて精白米を炊飯した結果，米に生じたアクリルアミドの平均濃度は，0.24-1.18 μg/kgの範囲にあった．本測定結果を日本人の炊飯米の摂取量と合わせて考えると，他の食品を含めたアクリルアミドの摂取量全体に対して，炊飯した精白米からのアクリルアミド摂取の寄与は小さいことが確認された．発芽玄米や玄米を炊飯した際のアクリルアミドの濃度は精白米の場合よりも高くなり，焦げの生じない炊き方で炊飯すればアクリルアミド摂取に対する寄与率は小さいが，焦げを生じさせるとアクリルアミドの摂取源の一つとして無視できないものとなり得ると考えられる．

Estimation of acrylamide intake from cooked rice in Japan

Mitsuru Yoshida[*1], Keiko Miyoshi[*2], Kaoru Horibata[*3], Yuzo Mizukami[*4], Makiko Takenaka[*1], Akemi Yasui[*1]

[*1] National Food Research Institute, NARO
[*2] Junior College of Kagawa Nutrition University
[*3] Kagawa Nutrition University
[*4] National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO

Chemistry Letters, 41 (3), 242-243 (2012)

A novel method to discriminate between natural and synthetic fibers by stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analyses

Yaeko Suzuki[*1, *2], Ryo Kobe[*1], Rumiko Nakashita[*1, *3]

[*1] Japan Certification Services
[*2] National Food Research Institute, NARO
[*3] Forestry and Forest Products Research Institute

化学繊維・動物繊維・植物繊維について，炭素・窒素・酸素安定同位体比を測定した．炭素・窒素同位体比は，動物繊維が最も高く，化学繊維は非常に低い値を示した．酸素同位体比は，植物繊維が動物繊維や化学繊維よりも高かった．動物繊維については，カシミヤは炭素同位体比が高く，アルパカは酸素同位体比が低い傾向が得られた．よって，安定同位体比分析によって繊維の原料判別の可能性が示唆された．

安定同位体比分析を用いた繊維の原料判別の可能性

鈴木彌生子[*1, *2]，河邉　亮[*1]，中下留美子[*1, *3]

[*1] 日本認証サービス株式会社
[*2]（独）農研機構食品総合研究所
[*3]（独）森林総合研究所

Researches in organic geochemistry 27, 73-79, (2011)

Ecological application of compound-specific stable nitrogen isotope analysis of amino acids-A case study of captive and wild bears

Rumiko NAKASHITA*[1], Yaeko SUZUKI*[2], Fumikazu AKAMATSU*[3], Yuichi I. NAITO*[4]
Miho SATO-HASHIMOTO*[5], Toshio TSUBOTA*[6]

*[1] Forestry and Forest Products Research Institute
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Public Works Research Institute
*[4] University of Tokyo
*[5] Gunma University
*[6] Hokkaido University

水棲動物のアミノ酸の窒素安定同位体比が，餌に対して，非必須アミノ酸であるグルタミン酸で約8.0‰高くなり，必須アミノ酸のフェニルアラニンではほとんど変化しないことから，生物に含まれる両者のアミノ酸窒素安定同位体比を比較することで，栄養段階や一次生産者の窒素同位体比を推定できると期待されている．本研究では，飼育個体３頭と餌食物との栄養段階を推定したところ，ほぼトウモロコシを摂取していた飼育個体の栄養段階は1.7-1.9（ほぼ２）という妥当な結果が得られた．さらに，ニジマスの養魚場周辺で，ニジマス被害に関連していた疑いで捕獲されたツキノワグマ３個体と，その周辺に生息していたコントロール３個体のアミノ酸窒素安定同位体比解析を行った．被害との関連性が疑われた３個体のうち２個体について，ニジマス被害との関連性が明らかとなり，残りの１個体はニジマスを摂取した可能性が低いと推定された．

アミノ酸の化合物別安定窒素同位体分析の生態学への応用 捕獲と野生熊でのケーススタディー

中下留美子*[1]，鈴木彌生子*[2]，赤松　史一*[3]，内藤　裕一*[4]，橋本　美穂*[5]，坪田　敏夫*[6]

*[1]（独）森林総合研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3]（独）土木研究所
*[4] 東京大学
*[5] 群馬大学
*[6] 北海道大学

日本食品科学工学会誌，58，259-262（2011）

安定同位体比分析によるしらす干しの原料原産地判別の可能性

小泉　鏡子*[1]，中下留美子*[2, *3]，鈴木彌生子*[2, *4]

*[1] 静岡県水産技術研究所
*[2] 日本認証サービス株式会社
*[3]（独）森林総合研究所
*[4]（独）農研機構食品総合研究所

本研究では，炭素・窒素安定同位体比分析によるしらす干しの原料原産地判別の可能性について検討した．国産しらす干しの炭素・窒素安定同位体比を用いてクラスター分析を行ったところ，国内９産地を九州，瀬戸内海東部から太平洋沿岸，瀬戸内海西部の３つのグループに分類することが出来た．各グループの炭素・窒素同位体比を比較すると，炭素同位体比は九州地方および瀬戸内海西部地方）が瀬戸内海東部から太平洋沿岸地方より有意に高く，窒素同位体比は瀬戸内海西部地方が九州地方および瀬戸内海東部から太平洋沿岸地方より有意に高かった．輸入しらす干しについては，炭素同位体比は中国産しらす干しが国産，韓国産よりも有意に高い値を示し，窒素同位体比は中国産が国産，韓国産よりも有意に低い値を示したが，国産と韓国産の間には炭素・窒素安定同位体とも有意差は見られなかった．以上の結果から，養殖ではなく天然海域で漁獲された水産物の加工品であるしらす干しにおいても安定同位体比分析による原料原産地判別の可能性が示唆された．

Stable isotope analysis for verifying the geographical origin of Shirasuboshi

Kyoko KOIZUMI*[1], Rumiko NAKASHITA*[2, *3], Yaeko SUZUKI*[2, *4]

*[1] Shizuoka Prefectural Research Institute of Fishery
*[2] Japan Certification Services
*[3] Forestry and Forest Products Research Institute
*[4] National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌，59，69-75（2012）

炭素・酸素安定同位体比分析による青森県産および中国産リンゴの産地判別の可能性

鈴木彌生子*[1,*4]，中下留美子*[1,*5]，河邉　亮*[1]，北井亜希子*[2]，富山　眞吾*[2,*3]

*[1] 日本認証サービス株式会社
*[2] 三菱マテリアルテクノ株式会社
*[3] 東北大学大学院工学研究科環境機能利用工学寄附講座
*[4] (独) 農研機構食品総合研究所
*[5] (独) 森林総合研究所

青森県（青森市，鶴田町，田舎館村，黒石市，弘前市，平賀町，西目屋村，大鰐町）および中国（山東省・甘粛省・遼寧省・陝西省・新疆ウイグル自治区）で収穫された素姓の確かなリンゴについて，炭素・酸素同位体比を測定し，産地判別の可能性を検証した．青森県産と中国産を比較すると，どの地域においても，青森県産は中国産よりも炭素・酸素同位体比ともに低い傾向が得られた．青森県産を地域別に比較すると，炭素同位体比においては，西目屋村が有意に低い値を示した．また，西目屋村や大鰐町は酸素同位体比が低い傾向が得られた．降水量や地形による生育水の酸素同位体比など複数の環境要因を反映していると考えられる．以上より，炭素・酸素安定同位体比分析を用いることにより，中国産と青森県産の判別だけではなく，青森県内においても，リンゴの産地判別の可能性が見出された．

Tracing the geographical origin of Japanese (Aomori Prefecture) and Chinese apples using stable carbon and oxygen isotope analyses

Yaeko Suzuki*[1,*4], Rumiko Nakashita*[1,*5], Ryo Kobe1*[1], Akiko Kitai*[2], Shingo Tomiyama*[2,*3]

*[1] Japan Certification Services
*[2] Mitsubishi Materials Techno Corporation
*[3] Tohoku University
*[4] National Food Research Institute, NARO
*[5] Forestry and Forest Products Research Institute

分析化学，60，563-570（2011）

青森県津軽平野を対象とした生育水と精米の軽元素安定同位体比の相関性

富山　眞吾*[1,*4]，鈴木彌生子*[2]，中下留美子*[3]，相川　良雄*[4]

*[1] 三菱マテリアルテクノ株式会社
*[2] (独) 農研機構食品総合研究所
*[3] (独) 森林総合研究所
*[4] 東北大学大学院工学研究科環境機能利用工学寄附講座

近年社会問題化しているコメの産地偽装問題に対し，科学的根拠に基づいた判別技術の確立が求められており，そのためにはコメと生育水の軽元素安定同位体比の相関性を確認する必要がある．本研究は，青森県津軽平野を対象に生育水の酸素・水素安定同位体比及び炭素安定同位体比の空間的分布を明らかにし，その上でコメの安定同位体比との相関性を検討した．津軽平野の中央部では平野縁辺部と比較して生育水の酸素・水素安定同位体比が高い傾向にある．δダイアグラム上における天水線の傾きは4.95であり，蒸発散により平野中央部では同位体比がシフトしている可能性を示している．コメの酸素安定同位体比は生育水と有意な相関を持ち，酸素安定同位体比によるコメの産地判別法の可能性が示唆された．生育水の炭素安定同位体比はpHと相関関係にあり，無機炭酸の化学種の存在比を反映している可能性がある．コメの炭素安定同位体比は生育水との相関が認められず，大気中CO_2を起源の大部分とし，土壌の水分条件など水利用環境の違いを反映した同位体比を示しているものと考えられる．

Correlation of stable isotope ratios of light elements between ambient water and polished rice, Tsugaru Plain, Aomori Prefecture

Shingo TOMIYAMA*[1,*4], Yaeko SUZUKI*[2], Rumiko NAKASHITA*[3], Yoshio AIKAWA*[4]

*[1] Mitsubishi Materials Techno Corporation
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Forestry and Forest Products Research Institute
*[4] Tohoku University

Animal Science Journal, 82 (1), 181-186 (2011)

Proteome analysis of whole and water-soluble proteins in masseter and semitendinosus muscles of Holstein cows

Mika OE*[1, *2], Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA*[3], Ikuyo NAKAJIMA*[1], Susumu MUROYA*[1, *5], Masahiro SHIBATA*[4]
Koichi OJIMA*[1], Shiro KUSHIBIKI*[1, *2], Koichi CHIKUNI*[1]

*[1] National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO
*[2] Graduate School of Life and Environmental Science, University of Tsukuba
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] National Agricultural Research Center for Western Region, NARO
*[5] Department of Food Science, University of Copenhagen

速筋と遅筋の定性的，定量的な相違を評価するため，ホルスタイン牛の咬筋（速筋）と半腱様筋（遅筋）におけるタンパク質発現を2D DIGEとMSにより分析した．8M尿素により抽出したタンパク質画分の27スポットから20のタンパク質，水溶性画分の16スポットから11のタンパク質を同定した．咬筋にはmyosin light chain-1 slow-bやmyosin light chain-2 slow，aconitase-2 mitochondriaが，半腱様筋にはmyosin light chain-1 fastやmyosin light chain-2 fast，myosin light chain-3 fast，tropomyosin-1などの筋繊維タンパク質に加え，解糖系のenolase-3, aldolase-A，triosephosphate isomeraseが有意に高濃度に存在していた．これらの結果から，速筋と遅筋では筋線維タンパク質だけでなく，筋小胞体タンパク質の組成も異なることが明らかになった．

ホルスタイン牛の咬筋と半腱様筋のタンパク質のプロテオーム解析

大江　美香*[1, *2]，亀山眞由美*[3]，中嶋　郁世*[1]，室谷　　進*[1, *5]，柴田　昌宏*[4]，尾嶋　孝一*[1]
櫛引　史郎*[1, *2]，千国　幸一*[1]

*[1]（独）農研機構畜産草地研究所
*[2] 筑波大学
*[3]（独）農研機構食品総合研究所
*[4]（独）農研機構近畿中国四国農業研究センター
*[5] コペンハーゲン大学

Carbohydrate Polymers, 87 (2), 1425-1432 (2011)

Enzymatically derived aldouronic acids from Cryptomeria japonica arabinoglucuronoxylan

Takashi Yamasaki*[1], Ayumi Enomoto*[1], Atsushi Kato*[2], Tadashi Ishii*[2], Mayumi Kameyama*[3], Hiroshi Anzai*[1], Kazumasa Shimizu*[1]

*[1] Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon University
*[2] Forestry and Forest Products Research Institute
*[3] National Food Research Institute, NARO

スギの木のホロセルロースから，10％水酸化カリウムでアラビノグルクロノキシランを抽出し，市販のセルラーゼから粗精製したキシラナーゼで加水分解した．切り出した中性糖をサイズ排除クロマトグラフィで分析した結果，キシロースのみから成る７糖までのオリゴ糖が存在することがわかった．また陰イオン交換クロマトグラフィでアルドウロン酸を精製した．単糖分析，陰イオン交換クロマトグラフィにおける容量分布係数の標品との比較，1H NMR，13CNMRの解析から，4-O-Me-α-D-GlcAp ２残基とD-Xyl ３～５残基から成る８種のアルドウロン酸であることがわかった．

ストレプトマイセスTM-34に含まれるアンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性を有する新規シデロフォア

山崎　隆志*[1]，榎本あゆみ*[1]，加藤　　厚*[2]，石井　　忠*[2]，亀山眞由美*[3]，安齋　　寛*[1]，志水　一允*[1]

*[1] 日本大学
*[2] 森林総合研究所
*[3]（独）農研機構食品総合研究所

European Journal of Organic Chemistry, 17, 3191-3196 (2011)

A new siderophore isolated from Streptomyces sp TM-34 with potent inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme

Shinya Kodani*[1, *2], Mayumi Ohnishi-Kameyama*[1], Mitsuru Yoshida*[1], Kozo Ochi*[1, *3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Current address: Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University
*[3] Current address: Faculty of Applied Information Science, Hiroshima Institute of Technology

ストレプトマイセスTM-34の鉄欠乏培地から新規シデロフォアを見いだし，ツクバケリンと名付けた．２次元NMRとTOFMSのデータから，ツクバケリンは３個のセリンとN-α-メチル-l-N-δ-ヒドロキシ-N-δ-フォルミルオルニチン，N-α-メチル-N-δ-ヒドロキシオルニチン，環化N-ヒドロキシオルニチンの合計６個のアミノ酸残基から成っていることがわかった．この化学構造と類似するシデロフォア，デスフェリ（鉄を配位していない）フォロキシミチンがアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示すことが報告されていたため，デスフェリツクバネケリンのこの酵素に対する阻害活性を調べた．デスフェリツクバネケリンは，デスフェリフォロキシミチンより14倍強い阻害活性を示したことから，鉄を配位していないツクバネケリンがアンジオテンシン変換酵素阻害剤として潜在的な可能性を有すると考えられた．

ストレプトマイセスTM-34に含まれるアンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性を有する新規シデロフォア

小谷　真也*[1, *2]，亀山眞由美*[1]，吉田　　充*[1]，越智　幸三*[1, *3]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 静岡大学
*[3] 広島工科大学

Genes, 2 (4), 788-803 (2011)

Identification of genes involved in the glycosylation of modified viosamine of flagellins in Pseudomonas syringae by mass spectrometry

Masanobu Yamamoto*, Mayumi Ohnishi-Kameyama*, Chi L. Nguyen**, Fumiko Taguchi**, Kazuhiro Chiku*
Tadashi Ishii*, Hiroshi Ono*, Mitsuru Yoshida* and Yuki Ichinose**

* National Food Research Institute, NARO
** Okayama University

われわれはこれまでに，タバコ野火病菌（Pta6605）の鞭毛タンパク質フラジェリンは糖タンパク質で，病原性の発現には修飾ビオサミン-ラムノース-ラムノースから成る三糖糖鎖が必要であることを明らかにするとともに，その糖鎖修飾に関わる遺伝子を同定してきた．今回，Pta6605のフラジェリンの糖鎖の非還元末端に存在する修飾ビオサミンの生合成を担う，ビオサミンアイランドと呼ばれる遺伝子群に，vioRとvioMという遺伝子が存在することを，それらの遺伝子の欠損変異株と質量分析法を用いて明らかにした．また，Pta6605と同じP. syringaeに属するが病原型が異なる菌株について，修飾ビオサミン関連遺伝子をPta6605と比較した．その結果，修飾ビオサミン関連遺伝子はPta6605以外の病原菌においてもフラジェリンの糖鎖合成に必須であること，ビオサミンアイランドを持たないP. syringae pv. syringae B728aではフラジェリンの糖鎖の構造が異なっていることが明らかになった．

植物病原菌Pseudomonas syringaeの鞭毛タンパク質フラジェリンの糖鎖を構成する
修飾ビオサミンの生合成に関与する遺伝子の同定

山本　雅信*，亀山眞由美*，Chi L. Nguyen**，田口冨美子**，知久　和寛*，石井　　忠*，小野　裕嗣*
吉田　　充*，一瀬　勇規**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 岡山大学

Journal of Agricaltural and Food Chemistry, 59 (18), 10317-10321 (2011)

Annual Variation of Natural 15N Abundance in Tea Leaves and Its Practicality as an Organic Tea Indicator

Nobuyuki Hayashi*[1], Tomomi Ujihara*[1], Eri Tanaka*[2], Yasuhiro Kishi*[2], Hideyuki Ogawa*[2] and Hirofumi Matsuo*[3]

*[1] National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO
*[2] Saitama Prefectural Agriculture and Forestry Research Center
*[3] Miyazaki Prefectural Agricultural Research Institute

有機肥料の施肥と有機栽培茶葉中のδ15N値の関係に関する基礎的知見を得るために，茶葉中のδ15N値の年次変動が調査された．δ15N値の変化は有機肥料の施肥後すぐには現れないが，δ15N値の低い有機肥料を用いた場合を除き，基本的に有機栽培開始３年後には有機栽培区では慣行栽培区よりも高いδ15N値が観測された．その変化量は使用した有機肥料のδ15N値に依存した．続いて，δ15N値が有機栽培茶の実用的な判別指標になり得るか否かを調べた．有機栽培を実施している茶生産者の圃場より採取した茶葉のδ15N値は市販の非有機栽培茶の値と比べ，必ずしも高くは無い事が判明した．この結果は，茶葉のδ15N値のみを根拠に有機栽培茶を判別することは容易ではない事を示している．

茶葉中の窒素安定同位体天然存在比の年次変動と有機栽培茶指標としてのその実用性

林　　宣之*[1]，氏原ともみ*[1]，田中　江里*[2]，岸　　保宏*[2]，小川　英之*[2]，松尾　啓史*[3]

*[1]（独）農研機構野菜茶業研究所
*[2] 埼玉県農林総合研究センター
*[3] 宮崎県総合農業試験場

Molecular Reproduction and Development, 78 (4), 263-273 (2011)

Comparison of liver mitochondrial proteins derived from newborn cloned calves and from cloned adult cattle
by two-dimensional differential gel electrophoresis

Kumiko Takeda*[1], Mariko Tasai*[1], Satoshi Akagi*[1], Shinya Watanabe*[1], Mika Oe*[1], Koichi Chikuni*[1]
Mayumi Ohnishi-Kameyama*[2], Hirofumi Hanada*[3], Yoshiaki Nakamura*[1, *4], Takahiro Tagami*[1], Keijiro Nirasawa*[1]

*[1] National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Laboratory of Animal Breeding, Tokyo University of Agriculture
*[4] Faculty of Agriculture, Shinshu University

動物のクローニングにおいて，ドナーの体細胞核の異常な再プログラミングが深刻な問題を引き起こすことが多い．畜牛の体細胞核移植（SCNT）におけるタンパク質発現についての詳細な知見はないため，本研究では，SCNT畜牛とコントロール，人工授精で生まれた仔牛のミトコンドリアのタンパク質レベルを調査した．凍結した肝臓試料からミトコンドリア画分を調製し2D-DIGEを行った結果，発現量が２倍以上異なるタンパク質が認められた．同じドナー細胞から発生した個体間でタンパク質発現のパターンは異なったが，新規なタンパク質の発現は認められなかった．ミトコンドリアにおけるタンパク質発現量は，生き延びることができないSCNT仔牛やSCNT牛の個体間で相違があった．この結果は，SCNT胚の発達初期にミトコンドリア関連遺伝子の発現が欠損していることを意味し，比較プロテオミクス分析は，SCNT動物の更なる研究のための重要なツールであることを示している．

クローン仔牛とクローン成牛における肝臓ミトコンドリアタンパク質の２次元電気泳動解析による比較

武田久美子*[1]，太齊真理子*[1]，赤木　悟史*[1]，渡邊　伸也*[1]，大江　美香*[1]，千国　幸一*[1]，亀山眞由美*[2]
花田　博文*[3]，中村　隼明*[1, *4]，田上　貴寛*[1]，韮沢圭二郎*[1]

*[1]（独）農研機構畜産草地研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 信州大学
*[4] 東京農業大学

食品総合研究所研究報告, 76, 51-57 (2012)

食用油の加熱によって生じる有害アルデヒド4-hydroxy-2E-nonenalおよびその類縁化合物4-hydroxy-2E-hexenalの定量分析

箭田　浩士，亀山眞由美

（独）農研機構食品総合研究所

油の加熱によって生成する有害アルデヒド，4-hydroxy-2E-nonenal(4-HNE）および4-hydroxy-2E-hexenal(4-HHE）を安定同位体で標識した内部標準を用いて定量分析する方法を開発した．この方法を用いて，様々な食用油を加熱した際に生成する4-HNE, 4-HHE量を調べた．その結果，4-HNEも4-HHEも加熱時間に応じて増加した．油の種類により4-HNEの生成量は５倍程度の差があり，n-6系多価不飽和脂肪酸の含有量の濃度の影響が大きいと考えられた．サラダ油を繰り返し天ぷら調理に使用した場合には，4-HNE, 4-HHE共に繰り返し使用の初期にPOVの上昇に遅れて増加した．その後，4-HNEはやがて頭打ちとなりほぼ一定の値を示したが，4-HHEは減少した．

Quantitative analysis of 4-hydroxy-2E-nonenal and 4-hydroxy-2E-hexenal in heated cooking oil

Hiroshi Yada and Mayumi Ohnishi-Kameyama

National Food Research Institute, NARO

日本食品科学工学会誌，59（1），6-16（2012）

釜炒り茶と煎茶の渋味の解析

松尾　啓史[*1, *4]，林　　宣之[*2]，氏原ともみ[*3]，藤田　　進[*1]，龍野　利宏[*1]，御手洗正文[*4]，槐島　芳徳[*4]
豊満　幸雄[*4]，木下　　統[*4]，谷口　知博[*4]

[*1] 宮崎県総合農業試験場
[*2]（独）農研機構食品総合研究所
[*3]（独）農研機構野菜茶業研究所
[*4] 宮崎大学

釜炒り茶と煎茶の渋味について味覚センサーを用いて比較を行ったところ，釜炒り茶は煎茶よりも渋味が少ないこと，煎茶では蒸熱時間が長くなると渋味が緩和されることが明らかとなった．味覚センサーでの渋味推定値を目的変数，浸出液のカテキンと水溶性ペクチン含有量を説明変数として重回帰分析を行った結果，渋味は浸出液のカテキンと水溶性ペクチン含有量で説明でき，カテキン含有量が多いほど，水溶性ペクチン含有量が少ないほど渋味が強くなることが判明した．浸出液のカテキンと水溶性ペクチン含有量は，釜炒り茶よりも煎茶で高い結果となったが，これは釜炒り茶の製茶工程では茶葉に対して煎茶ほど揉圧が加えられないためと考えられた．また茶葉中の水溶性ペクチンは蒸熱時間が長くなると増加し，恒率乾燥が保たれる殺青以降の工程では明確な増加が見られないことから，茶葉が90～100℃程度に加熱される工程で増加するものと推察された．

Astringency of Kamairi-cha nad Sen-cha

Hirofumi Matsuo[*1, *4], Nobuyuki Hayashi[*2], Tomomi Ujihara[*3], Susumu Fujita[*4], Toshihiro Tatsuno[*4], Masafumi Mitarai[*4]
Yoshinori Gejima[*4], Yukio Toyomitsu[*4], Osamu Kinoshita[*4] and Tomohiro Taniguchi[*4]

[*1] Miyazaki Prefectural Agricultural Research Institute
[*2] National Food Research Institute, NARO
[*3] National Institute of Vegetable and Tea Science, NARO
[*4] University of Miyazaki

CrystEngComm, 13, 4536-4548 (2011)

Crystal structures and chiral recognition of the diastereomeric salts prepared from 2-methoxy-2-(1-naphthyl) propanoic acid

Akio Ichikawa*[1], Hiroshi Ono*[2], Takuya Echigo*[3], Yuji Mikata*[4]

*[1] National Institute of Agrobiological Sciences
*[2] National Food Research Institute, NARO,
*[3] Japan International Research Center for Agricultural Sciences
*[4] Nara Women's University

本論文は，(R)-2-メトキシ-2-(1-ナフチル) プロパン酸［(R)-MαNP酸，(R)-1］と(S)-1のそれぞれ(R)-1-フェネチルアミン［(R)-PEA，(R)-7］との結晶性ジアステレオマー塩の構造に関する最初の報告である．これらの結晶構造はMαNP塩の新規な不斉認識機構を解明する上での有用である．(R)-1と (R)-7から得られる溶解度の低いジアステレオマー塩8は，メトキシ基の補助による塩橋と芳香環CH/π相互作用によってアンモニウム-カルボキシレートのイオン対を形成していた．(S)-1と(R)-7から得られる溶解度のより高いジアステレオマー塩9は，1-ナフチル基とフェニル基が重ならず，メトキシ基の補助による塩橋によりイオン対を形成していた．それどころか，塩9は塩橋，CH/O水素結合とπ／π相互作用によって，接近したイオン対を形成していた．これらの結晶構造はカルボキシ基とメトキシ基を含むMαNP平面からの分子長がジアステレオマー塩の結晶化に重要であることを示唆している．これら両方の塩の結晶充填を弱い相互作用（塩橋，NH/OとCH/Oの水素結合，芳香族CH/π，CH/π，π/π相互作用）について検討した．最後に，(S)-2-メトキシ-2-(2-ナフチル) プロパン酸［(S)-MβNP acid，(S)-2］と(R)-2それぞれの(S)-1-(1-ナフチル) エチルアミン［(S)- 10］とのジアステレオマーアミド11と12を調製した．MβNPアミドの溶液中の構造と分離について，NMRとHPLCで検討した．立体化学の制約がより少ないことと，長い2-ナフチル基はMβNPをMαNPよりフレキシブルで低極性としている．酸２は酸１よりアミド11と12を分離する上で効果的であった．

2-メトキシ-2-(1-ナフチル) プロパン酸から調製したジアステレオマー塩の結晶構造と不斉認識

市川　明生*[1]，小野　裕嗣*[2]，越後　拓也*[3]，三方　裕司*[4]

*[1] (独) 農業生物資源研究所
*[2] (独) 農研機構食品総合研究所
*[3] (独) 国際農林水産業研究センター
*[4] 奈良女子大学

Journal of Peptide Science, 17 (8), 595-600 (2011)

Increasing the hydrolysis constant of the reactive site upon introduction of an engineered Cys14-Cys39 bond into the ovomucoid third domain from silver pheasant

Hikaru Hemmi*[1], Takashi Kumazaki*[2], Shuichi Kojima*[3], Takuya Yoshida*[4], Tadayasu Ohkubo*[4], Hideyoshi Yokosawa*[5]
Kin-ichiro Miura*[3], Yuji Kobayashi*[6]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Aomori University
*[3] Department of Life Science, Faculty of Science, Gakushuin University
*[4] Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
*[5] School of Pharmacy, Aichi Gakuin University
*[6] Osaka University of Pharmaceutical Sciences

プロテアーゼインヒビターであるキジ卵白由来オボムコイド第３ドメイン（OMSVP3）の変異体であるP14C/N39Cは，ホヤ由来トリプシンインヒビターとの配列類似性を基に阻害反応部位近傍に新たにCys14-Cys39のジスルフィド結合を導入した変異体である．すでに，筆者等は，この変異体がより狭い阻害活性特異性を持つこと，NMRによる立体構造解析から阻害活性部位を含むN末端ループ構造のみ大きな構造変化が生じることを報告している．今回，さらに，その阻害活性特異性の変化のメカニズムを解明するため，熱安定性及び加水分解定数についての解析を行い，野性体との比較を行った．その結果，野性体と比べ，熱安定性に変化が見られなかったにもかかわらず，加水分解定数においては有意に上昇が見られた．従って，この変異体のようにN末端ループ構造へのジスルフィド結合の新規導入法は，ペプチド結合加水分解阻害反応部位の熱力学解析のための有意義な方法である．

キジ卵白由来オボムコイド第３ドメイン（OMSVP3）の阻害活性部位へのCys14-Cys39のジスルフィド結合を
新規に導入した変異体の加水分解定数の増加

逸見　　光*[1]，熊崎　　隆*[2]，小島　修一*[3]，吉田　卓也*[4]，大久保忠恭*[4]，横沢　英良*[5]，三浦謹一郎*[3]，小林　裕次*[6]

*[1] (独) 農研機構食品総合研究所
*[2] 青森大学薬学部
*[3] 学習院大学理学部
*[4] 大阪大学薬学部
*[5] 愛知学院大学薬学部
*[6] 大阪薬科大学

International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62 (7), 671-677 (2011).

The use of summary statistics for sample size allocation for food composition surveys and an application to the potato group

Yoshiki Tsukakoshi, Akemi Yasui

National Food Research Institute, NARO

食品成分表に掲載されるようなデータの取得には，どのように分析および調査の資源を振り分けることによって，最適な配分が達成できるかという問題がある．そこで，イモ類について，比例配分，ネイマン配分などの配分法を調べて，栄養調査における調査精度に与える影響を調査した．

食品調査におけるサンプルサイズ配分に関する検討

塚越　芳樹，安井　明美

（独）農研機構食品総合研究所

Applied Physics Letters, 99 (1), 011913 (2011).

Surface plasmon modes guided by Ga-doped ZnO layers bounded by different dielectrics

Wasanthamala Badalawa*, Hiroki Matsui*, Akifumi Ikehata**, Hitoshi Tabata*

* Kwansei Gakuin University
** National Food Research Institute, NARO

GaをドープしたZnO（ZnO: Ga）膜を導波する空気とガラス面に生じる２種の表面プラズモン（SP）モードについて報告する．leaky波成分を持つ対称SPモードはZnO: Ga膜の厚さが107–141 nmの場合において空気－ZnO界面に生じる．この結果としてガラス－ZnO界面において非対称SPモードが残存することが確認された．有限差分時間領域（FDTD）シミュレーションによってこれらのモードはZnO:Ga膜の厚さによって高いカットオフを示し，界面近傍に強く閉じ込められたSP場であることが明らかとなった．

異なる誘電体に接したGaドープZnO層によって導波される表面プラズモンモード

ワサンタマーラ・バダラワ*，松井　裕章*，池羽田晶文**，田畑　　仁*

* 東京大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Applied Spectroscopy, 66 (1), 1-25 (2012)

Far-ultraviolet spectroscopy in the solid and liquid states: A review

Yukihiro Ozaki*[1], Yusuke Morisawa*[1], Akifumi Ikehata*[2], Noboru Higashi*[3]

*[1] Kwansei Gakuin University
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] KURABO Industries Ltd.,

従来の紫外可視分光の範囲より短波長の190 nm以下の遠紫外領域は豊富な電子繊維吸収に由来する情報が豊富である．しかしながら吸収強度が強すぎるため，遠紫外分光はガス状態にのみ使われてきた．この問題を克服するため，我々はattenuated total reflection（ATR）法を用いて140–280 nmでの液体および固体の遠紫外分光法を開発した．装置に関する詳細，水や水溶液の基礎的特徴，有機溶媒の基礎的特徴，量子化学計算による遠紫外スペクトルの帰属，オンライン分析や，高分子材料，地質学への応用を含む遠紫外分光法の利用について紹介する．

液体および固体の遠紫外分光法：総説

尾崎　幸洋*[1]，森澤　勇介*[1]，池羽田晶文*[2]，東　　昇*[3]

*[1] 関西学院大学
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 倉敷紡績株式会社

Journal of Near Infrared Spectroscopy, 19 (1), 55-60 (2011)

Short communication: A feasibility study using simplified near infrared imaging to detect fruit fly larvae in intact fruit

Sirinnapa Saranwong*[1], Ronald Haff*[2], Warunee Thanapase*[3], Athit Janhiran*[3], Sumaporn Kasemsumran*[3], Sumio Kawano*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] ARS-USDA
*[3] Kasetsart University

近赤外（NIR）イメージング技術によってマンゴーのミバエ汚染を調べた．産卵から０時間，24時間および48時間後に400-1000 nmのハイパースペクトルデータを取得した．８個のテスト用マンゴーと８個のコントロールを比較した．反復ベイズ判別分析ルーチンによって３つの波長帯を使用して48時間後のデータを比較したところ，偽陰性0.9％，擬陽性5.7％の分類結果を得た．マハラノビス距離に基づいてミバエ汚染の状態を可視化することに成功した．

単純化された近赤外イメージング法を用いた果実のミバエ汚染検出の可能性

シリンナパー・サランウォング*[1]，ロナルド・ハフ*[2]，ワルニー・タナパ*[3]，アチット・ジャンヒラン*[3]
スマポルン・カゼムサムラン*[3]，河野　澄夫*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 米国農務省ARS西部研
*[3] カセサート大学，

Food Science and Technology Research, 17 (3), 227-232 (2011)

Determination of crude protein in macaroni products by the combustion method and comparison with the Kjeldahl method: interlaboratory study

Akiko HAKODA*, Yusuke II*, Shigehiro NAITO**, Tadanao SUZUKI*, **, Akemi YASUI**

*[1] Food and Agricultural Materials Inspection Center
** National Food Research Institute, NARO

日本農林規格（JAS規格）で規程されたマカロニ製品の粗たん白質定量法として，燃焼法の室間再現精度を評価するために室間共同試験を実施した．室間共同試験には14試験室が参加し，５材料（非明示２反復の５対）を国内でよく利用されている６機種で測定した結果，併行相対標準偏差は0.16%k～0.53%，室間再現相対標準偏差は0.89%～1.1%の分析性能が得られた．HorRat（Horwitz比）は0.25～0.31であった．燃焼法の分析性能の結果を同じ５材料をケルダール法で定量した前報の結果と比較したところ，二つの方法の平均値の差は0.10%（m/m）～0.13%（m/m）であり，これらの差はJAS規格マカロニ製品の粗たん白質の基準値である11%（m/m）と12%（m/m）付近の判定に大きな影響は与えない．

燃焼法によるマカロニ製品の粗たん白質定量及びケールダール法との比較：室間共同試験

箱田　晃子*，井伊　悠介*，内藤　成弘**，鈴木　忠直*,**，安井　明美**

*（独）農林水産消費安全技術センター
**（独）農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌，58(12)，597-603（2011）

市田柿の品質管理への小型MRIの応用

深井　洋一*[1]，田中　廣彦*[2]，内藤　成弘*[3]

*[1]（社）長野県農村工業研究所
[2] JAみなみ信州，[3]（独）農研機構食品総合研究所

市田柿の水分分布が関係するカビ発生について新たな知見を得る目的で，予め試験品として選別した健全品とカビ発生品の水分分布を磁気共鳴画像（MRI）法を用いて検討した．カビ発生品と健全品をスピンエコー法を用いて，0.2テスラの永久磁石と１辺12 cmの開口部をもつ検出器を備えた小型MRIで一緒に測定した．水分及び水分活性に有意差が認められない（$p > 0.05$）健全品とカビ発生品のMR画像では，NMR信号の強さをMR画像の明るさで表現した場合，両者の明るさに明瞭な違いが認められた．カビ発生品は健全品よりも中果皮，内果皮ともに明るくなるが，内果皮が特に明るくなった．T1及びT2緩和時間測定の結果，MR画像の明るい部分では運動性の高い水が増えていた．この明るさの違いは，市田柿のへた側から尻側までのどの横断面でも見られた．MRIは市田柿の健全品とカビ発生品の水分分布の違いを，水の運動性の違いからとらえることができたため，品質管理の手段として実用化の進展が期待される．

Magnetic Resonance Imaging Applied to Quality Control of “Ichidagaki” Dried Persimmon Fruit

Yoichi Fukai*[1], Hirohiko Tanaka*[2], Shigehiro Naito*[3]

*[1] Agricultural Technology Institute of Nagano Farmers' Federation
*[2] JA Minami-Shinsyu, *[3] National Food Research Institute, NARO

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34(10)1648-1651(2011)

Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus YK strain

Kosuke NAKAMURA*[1], Hiroshi AKIYAMA*[1], Kiyomi OHMORI*[2], Yuki TAKAHASHI*[3], Reona TAKABATAKE*[4]
Kazumi KITTA*[4], Hiroyuki NAKAZAWA*[3], Kazunari KONDO*[1], Reiko TESHIMA*[1]

*[1] National Institute of Health Sciences
*[2] Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health
*[3] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University
*[4] National Food Research Institute, NARO

パパイヤを主原料とする加工食品中から，未承認遺伝子組換えパパイヤ（Carica papaya Linnaeus）が検知された．パパイヤリングスポットウィルスYK株の感染に対し，抵抗性を有するよう作り出された遺伝子組換えベクターのコンストラクトを同定した．遺伝子組換えパパイヤのパパイヤ加工品中への混入の有無を定性的にモニターするために，リアルタイムPCRに基づく特異的検知法を開発した．

パパイヤリングスポットウィルスYK株抵抗性遺伝子組換えパパイヤの検知法開発

中村　公亮*[1]，穐山　　浩*[1]，大森　清美*[2]，高橋　勇貴*[3]，高畠令王奈*[4]，橘田　和美*[4]，中澤　裕之*[3]
近藤　一成*[1]，手島　玲子*[1]

*[1] 国立医薬品食品衛生研究所
*[2] 神奈川県衛星研究所理化学部
*[3] 星薬科大学薬品分析化学教室
*[4]（独）農研機構食品総合研究所

Food Hygiene and Safety Science, 52 (2) 100-107 (2011)

Development and evaluation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified soybean A2704-12

Reona TAKABATAKE*[1], Hiroshi AKIYAMA*[2], Kozue SAKATA*[2], Mari ONISHI*[3], Tomohiro KOIWA*[4], Satoshi FUTO*[3]
Yasutaka MINEGISHI*[5], Reiko TESHIMA*[2], Junichi MANO*[1], Satoshi FURUI*[1], Kazumi KITTA*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] National Institute of Health Sciences
*[3] FASMAC Co., Ltd.
*[4] Food and Agricultural Materials Inspection Center
*[5] NIPPON GENE, Co., Ltd.

GMダイズ系統A2704-12の系統特異的定量分析法を開発し，試験室間共同試験による妥当性確認を実施した．A2704-12は，ゲノム中に複数のpUC19由来のDNA断片が存在することから，特異的PCR増幅領域として，これらの配列を用いた．pUC19を鋳型にPCRを行ったところ非特異的な増幅が観察されたため，定量用標準プラスミドの構築にはpUC19ではなく，別の汎用プラスミドpBR322を用いた．また，本研究によって，A2704-12混入率算出の際に必要な係数である内標比を実験的に決定した．さらに，複数の濃度のA2704-12を含む疑似混入試料を調製し，試験室間共同試験を実施したところ，本分析法の定量下限値は0.1%と見積もられ，偏差，室間再現相対標準偏差ともに20%を下回る結果が得られた．

遺伝子組換え大豆A2704-12系統の特異的定量PCR法の開発および評価

高畠令王奈*[1]，穐山　　浩*[2]，坂田こずえ*[2]，大西　真理*[3]，小岩　智宏*[4]，布藤　　聡*[3]
峯岸　恭孝*[5]，手島　玲子*[2]，真野　潤一*[1]，古井　　聡*[1]，橘田　和美*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 国立医薬品食品衛生研究所
*[3] 株式会社ファスマック
*[4]（独）農林水産消費安全技術センター
*[5] 株式会社ニッポンジーン

Food Hygiene and Safety Science, 52 (4) 265-269 (2011)

Interlaboratory validation of quantitative duplex real-time PCR method for screening analysis of genetically modified maize

Reona TAKABATAKE*[1], Tomohiro KOIWA*[2], Masaki KASAHARA*[2], Kaori TAKASHIMA*[1], Satoshi FUTO*[3], Yasutaka MINEGISHI*[4]
Hiroshi AKIYAMA*[5], Reiko TESHIMA*[5], Taichi OGUCHI*[1], Junichi MANO*[1], Satoshi FURUI*[1], Kazumi KITTA*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Food and Agricultural Materials Inspection Center
*[3] FASMAC Co., Ltd.
*[4] NIPPON GENE, Co., Ltd.
*[5] National Institute of Health Sciences

遺伝子組換え（GM）トウモロコシ二重リアルタイムPCR定量法に関して，試験室間共同試験により妥当性を確認した．本検知法は，２種類の蛍光色素を利用することにより，カリフラワー・モザイク・ウイルス35Sプロモーター（P35S）配列と，GA21系統特異的配列を同時に検出可能である．本室間共同試験によって，混入率算出の際に必要となる内標比が実験的に決定された．また，ブラインド定量試験の結果から，本分析法の定量下限値は，P35S，GA21ともに0.5%以下と見積もられた．また，偏差および室間再現標準偏差は，それぞれ，20%および25%を下回る結果が得られた．本法は，GMトウモロコシのスクリーニング定量分析法として有用である．

遺伝子組換えトウモロコシのスクリーニング分析のための定量的多重リアルタイムPCRによる妥当性確認

高畠令王奈*[1]，小岩　智宏*[2]，笠原　正輝*[2]，高島かおり*[1]，布藤　　聡*[3]，峯岸　恭孝*[4]，穐山　　浩*[5]，手島　玲子*[5]
小口　太一*[1]，真野　潤一*[1]，古井　　聡*[1]，橘田　和美*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2]（独）農林水産消費安全技術センター
*[3] 株式会社ファスマック
*[4] 株式会社ニッポンジーン
*[5] 国立医薬品食品衛生研究所

Food Science and Technology Research, 17 (6) 499-504 (2011)

Immunoblotting analysis of nsLTP1 in cereal grains with antiserum raised against recombinant rice nsLTP1

Gang-hua LANG*, Yukari KAGIYA*, Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA*, Shinichi KAWAMOTO*
Tatsuya MORIYAMA**, Kazumi KITTA*

* National Food Research Institute, NARO
** Kinki University

Nonspecific lipid transfer protein 1（nsLTP1）は植物中に広く存在し，植物の汎アレルゲンとして認識されている．本研究においては，大腸菌において発現させたイネnsLTP1組換えタンパク質を，抗原としてウサギに免役することで抗血清を得た．得られた抗血清はイネnsLTP1および他の穀物種子のnsLTP1相同タンパク質を特異的に認識した．さらに，抗血清を用いて，イネ品種間或いは，精米によるコメ画分間のnsLTP1含量の比較を行ったところ，品種間でnsLTP1含量に大きな差異が見られた．また，nsLTP1はコメの外層に局在し，精米によりnsLTP1含量を減少させることが可能であることを見出した．

イネnsLTP1組換えタンパク質に対する抗体を用いた穀物種子中に存在するnsLTP1タンパク質の免疫ブロティング解析

郎　　剛華*，鍵屋ゆかり*，大西（亀山）真由美*，川本　伸一*，森山　達哉**，橘田　和美*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 近畿大学

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (13) 6856-6863 (2011)

Practicable group testing method to evaluate weight/weight GMO content in maize grains

Junichi MANO*1, Yuka YANAKA*1, Yoko IKEZU*1, Mari ONISHI*2, Satoshi FUTO*2, Yasutaka MINEGISHI*3, Kenji NINOMIYA*4
Yuichi YOTSUYANAGI*4, Frank SPIGELHALTER*5, Hiroshi AKIYAMA*6, Reiko TESHIMA*6, Akihiro HINO*1, Shigehiro NAITO*1
Tomohiro KOIWA*7, Reona TAKABATAKE*1, Satoshi FURUI*1, Kazumi KITTA*1

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 FASMAC Co., Ltd.
*3 NIPPON GENE, Co., Ltd.
*4 Shimadzu Corporation
*5 GeneScan, Inc.
*6 National Institute of Health Sciences
*7 Food and Agricultural Materials Inspection Center

遺伝子組換えトウモロコシ掛け合わせ品種（スタック品種）の増加により，これまでに確立されている定量PCR法は，実際の重量比に比べて組換え体混入率を過大に評価する傾向にある．そこで本研究では，定量PCR法に代わる方法としてグループテスティング法を考案し，その検討を行った．グループテスティング法は，20粒の穀粒からなる複数のグループを定性分析した結果から，統計学的に組換え体混入率を算出する方法である．この方法は，スタック品種の混入に影響を受けることなく，重量混合比で組換え体混入率を評価することが可能である．グループテスティング法を実際の検査に利用しやすくするため，簡易なサンプル調製法とトウモロコシの粗抽出液から直接分析が可能なPCR分析条件を確立した．一連の分析法は複数試験室共同試験により妥当性が確認された．

トウモロコシ穀粒中の遺伝子組換え体混入率測定を目的とした実用的なグループテスティング法

真野　潤一*1，谷中　有香*1，池津　陽子*1，大西　真理*2，布藤　　聡*2，峯岸　恭孝*3，二宮　健二*4，四柳　雄一*4
Frank SPIGELHALTER*5，穐山　　浩*6，手島　玲子*6，日野　明寛*1，内藤　成弘*1，小岩　智宏*7，高畠令王奈*1
古井　　聡*1，橘田　和美*1

*1（独）農研機構食品総合研究所
*2 株式会社ファスマック
*3 株式会社ニッポンジーン
*4 島津製作所
*5 GeneScan, Inc.
*6 国立医薬品食品衛生研究所
*7（独）農林水産消費安全技術センター

Journal of AOAC International, 94 (5) 1540-1547 (2011)

Interlaboratory study of DNA extraction from multiple ground samples, multiplex real-time PCR, and multiplex qualitative PCR
for individual kernel detection system of genetically modified maize

Hiroshi AKIYAMA*1, Kozue SAKATA*1, Daiki MAKIYAMA*1, Kosuke NAKAMURA*1, Reiko TESHIMA*1, Akie NAKASHIMA*2
Asako OGAWA*3, Toru YAMAGISHI*4, Satoshi FUTO*5, Taichi OGUCHI*6, Junichi MANO*6, Kazumi KITTA*6

*1 National Institute of Health Sciences
*2 Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Health and Environment Center
*3 Yokohama Quarantine Station
*4 Kobe Quarantine Station
*5 FASMAC Co., Ltd.
*6 National Food Research Institute, NARO

穀粒，飼料，食品原材料において遺伝子組換え農産物の混入率が一定レベル以上にあった場合，多くの国において対象物への表示が義務付けられている．我々は以前に個別の穀粒の粉砕，DNA抽出，マルチプレックスリアルタイムPCR，マルチプレックス定性PCRからなる粒単位検査法を開発している．本研究では，粒単位検査法の適用性，実用性，頑健性を評価することを目的として，穀粒の粉砕，マルチプレックスリアルタイムPCR及びマルチプレックス定性PCRの試験室間共同試験を行った．日本国内の５試験室で試料の分析を行った結果，全ての試験室で組換え体の混入とその系統の識別に関して，いずれも期待された通りの結果が得られた．この結果から，穀粒からのDNA抽出，マルチプレックスリアルタイムPCR，マルチプレックス定性PCRは，スタック品種を含めた組換えトウモロコシの混入レベルの規制を目的とする試験室において利用可能である．

遺伝子組換えトウモロコシ粒単位検査法におけるDNA抽出，マルチプレックスリアルタイムPCR
及びマルチプレックス定性PCRの試験室間共同試験

穐山　　浩*1，坂田こずえ*1，牧山　大樹*1，中村　公亮*1，手島　玲子*1，中島安基江*2，小川　麻子*3，山岸　　亨*4
布藤　　聡*5，小口　太一*6，真野　潤一*6，橘田　和美*6

*1 国立医薬品食品衛生研究所
*2 広島県立総合技術研究所保健環境センター
*3 横浜検疫所
*4 神戸検疫所
*5 株式会社ファスマック
*6（独）農研機構食品総合研究所

Metrologia, 49 (08002) (2012)

CCQM-K86/P113.1: Relative quantification of genomic DNA fragments extracted from a biological tissue

Philippe CORBISIER*1, Sandra VINCENT*1, Heinz SCHIMMEL*1, Anna Maria KORTEKAAS*1, Stefanie TRAPMANN*1
Malcolm BURNS*2, Claire BUSHELL*2, Müslüm AKGOZ*3, Sema AKYÜREK*3, Lu DONG*4, Boqiang FU*4, L ZHANG*4
Jing WANG*4, Melina Pérez URQUIZA*5, J L BAUTISTA*5, A GARIBAY*5, B FULLER*5, Anna BAOUTINA*6, Lina PARTIS*6
Kerry EMSLIE*6, Marcia HOLDEN*7, W Y CHUM*8, Hyong-Ha KIM*9, Nittaya PHUNBUA*10, Mojca MILAVEC*11
Jana ZEL*11, Maxim VONSKY*12, Leonid A KONOPELKO*12, T L T LAU*13, B YANG*13, M H K HUI*13, A C H YU*13
Dongkamol VIROONUDOMPHOL*14, C PRAWETTONGSOPON*14, K WIANGNON*14, Reona TAKABATAKE*15
Kazumi KITTA*15, Mamoru KAWAHARASAKI*16, Helen PARKES*2

*1 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Joint Research Centre, European Commission, Geel, Belgium
*2 LGC, Teddington, United Kingdom
*3 TÜBITAK UME, Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Turkey
*4 National Institute of Metrology P. R. China, Beijing, China
*5 Central Nacional de Metrología, Del Marqués Qro, Mexico
*6 National Measurement Institute Australia, Pymble, Australia
*7 National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA
*8 Government Laboratory Hong Kong, Kowloon, Hong Kong
*9 Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Republic of Korea
*10 Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand
*11 National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia
*12 D.I. Mendeleev Institute for Metrology, St Petersburg, Russian Federation
*13 Peking University, Beijing, China
*14 National Institute of Metrology Thailand, Pathumthani, Thailand 12120
*15 National Food Research Institute, NARO, Ibaraki, Japan
*16 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan

基幹国際比較CCQM-K86は，遺伝子組換え（GM）トウモロコシMON810が一定量含まれた生物試料中のゲノムDNAの二箇所の特異的配列を利用した相対定量に関して，国家計量標準機関（NMI）および指名計量標準機関（DI）の校正・測定能力を明らかにするため実施された．本研究は，“粉砕トウモロコシ種子試料から抽出された，単一ゲノムDNA内に存在する70〜100ヌクレオチドの長さの特定塩基配列のコピー数比を用いた定量”の測定要求事項を裏付けるものである．本研究は，物質量諮問委員会（CCQM）のバイオアナリシスワーキンググループ（BAWG）による支援および標準物質及び計量技術研究所（IRMM）による指導の下行われた．報告された11機関の結果には，良い呼応が認められた．

CCQM-K86/P113.1: 生物試料から抽出されたゲノムDNAによる相対定量

Philippe CORBISIER*1，Sandra VINCENT*1，Heinz SCHIMMEL*1，Anna Maria KORTEKAAS*1，Stefanie TRAPMANN*1
Malcolm BURNS*2，Claire BUSHELL*2，Müslüm AKGOZ*3，Sema AKYÜREK*3，Lu DONG*4，Boqiang FU*4，L ZHANG*4
Jing WANG*4，Melina Pérez URQUIZA*5，J L BAUTISTA*5，A GARIBAY*5，B FULLER*5，Anna BAOUTINA*6
Lina PARTIS*6，Kerry EMSLIE*6，Marcia HOLDEN*7，W Y CHUM*8，Hyong-Ha KIM*9，Nittaya PHUNBUA*10
Mojca MILAVEC*11，Jana ZEL*11，Maxim VONSKY*12，Leonid A KONOPELKO*12，T L T LAU*13，B. YANG*13，M. H K HUI*13
A C H Yu*13，Dongkamol VIROONUDOMPHOL*14，C PRAWETTONGSOPON*14，K. WIANGNON*14，高畠令王奈*15
橘田　和美*15，川原崎　守*16，Helen PARKES*2

*1 標準物質計測研究所（ベルギー）
*2 LGC（イギリス）
*3 トルコ科学技術研究会議国家計量標準研究所（トルコ）
*4 中国計量科学研究所（中国）
*5 国家計量研究機関（メキシコ）
*6 オーストラリア国家計量機関（オーストラリア）
*7 米国標準技術局（アメリカ）
*8 香港政府研究所（香港）
*9 韓国標準研究所（韓国）
*10 厚生省医科学局（タイ）
*11 国際生物学研究所（スロベニア）
*12 D. I. メンデレーエフ計量科学研究所（ロシア連邦）
*13 北京大学（中国）
*14 タイ国家計量標準機関
*15（独）農研機構食品総合研究所
*16（独）産業技術総合研究所

食品総合研究所研究報告，76，17-22（2012）

Cooking and roasting effect on composition and digestibility of common bean proteins

Michiko Momma*, Keiko Sasaki**, Kiyoshi Ohba**, Seiichiro Isobe*

* National Food Research Institute, NARO
** Hokkaido Tokachi Area Regional Food Processing Technology Center

いんげん豆蛋白質の有効利用を図るため，生餡加工，ペースト化における細胞粒子形成ならびに蛋白質組成への影響について調べたところ，いんげん豆の全粒加熱調理により耐消化性細胞粒子が形成され，蛋白質の利用効率が低下するが，一方でペプシンに耐性をもつレグミン塩基性サブユニットが除去されることが示された．いんげん豆主要蛋白質ファゼオリンの消化性を高めレグミンの混入を防ぐことを目的に，粉砕前に焙煎処理を行った．焙煎処理によってファゼオリンはペプシン分解を受けやすくなったが，痕跡量のファゼオリン，レクチンおよび15 kDaタンパク質の残存が見られた．焙煎粉末ではペプシン耐性蛋白質であるレグミンのバンドは観察されなかった．本研究により，加熱処理条件による，いんげん豆調理製品の蛋白質組成ならびに消化性制御の可能性が示唆された．

いんげん豆加工処理が耐消化性粒子の形成，蛋白質組成ならびに試験管内消化性に与える影響について

門間美千子*，佐々木香子**，大場　　潔**，五十部誠一郎*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 財団法人十勝圏振興機構食品加工技術センター

Food Chemistry, 129, 104-109 (2011)

Effect of antioxidants on heat-induced trans fatty acid formation in triolein and trilinolein

Wakako Tsuzuki

National Food Research Institute, NARO

脂質の不飽和結合における熱誘導性シス－トランス異性化反応に対する抗酸化剤の効果を調べた．トリオレインやトリリノレインに，トコフェロール，ローズマリー抽出物，背差モールなどの抗酸化剤を添加して，180℃に加熱し，不飽和脂肪酸の熱酸化と熱誘導性のトランス異性化の反応をGC分析で調べた．まず，窒素気流下で，これらの油脂を加熱したところ，脂質の不飽和結合の熱劣化とトランス異性化はほとんど進行せず，これらの反応には酸素が必要であることが示された．また，抗酸化剤を脂質に添加すると，加熱中の脂質の不飽和結合の熱劣化とトランス異性化の両方が同時に抑制されることがわかった．添加する抗酸化剤の種類や濃度は，熱劣化とトランス異性化の反応の進行速度に影響を与えていたが，熱劣化反応と熱誘導性のトランス異性化反応は連動して生じることが示唆された．

トリオレインやトリリノレインの熱誘導性トランス異性化生成に対する抗酸化剤の効果

都築　和香子

（独）農業機構食品総合研究所

Food Science and Technology Research, 17 (2), 121-128 (2011)

Effects of rice properties on bread made from cooked rice and wheat flour blend

Keiko Iwashita, Keitaro Suzuki, Kanae Miyashita, Tomoya Okunishi

National Food Research Institute, NARO

小麦粉の一部を炊飯米で代替した「ごはんパン」の膨らみには，米成分ではアミロース含量が，炊飯米特性では表層の粘りが大きく影響することがわかりました．グルテン膜にかわり糊化澱粉が観察されました．

ごはんパンにおける炊飯米特性の影響

岩下　恵子，鈴木啓太郎，宮下　香苗，奥西　智哉

（独）農研機構食品総合研究所

Plant and Cell Physiology, 52 (10), 1822-1831 (2011)

Allocation of absorbed light energy in PSII to thermal dissipations in the presence or absence of PsbS subunits of rice

Satoshi Ishida*, Ken-ichi Morita*[1], Masahiro Kishine*[2], Atsushi Takabayashi*[1], Reiko Murakami*[1], Satomi Takeda*[3]
Ko Shimamoto*[4], Fumihiko Sato*[1], Tsuyoshi Endo*[1]

*[1] Kyoto University
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Osaka Prefecture University
*[4] Nara Institute of Science and Technology

光化学系IIに吸収された光エネルギーの熱放散（TD）は，光合成における重要な光防御機構であると考えられている．TDの一部は，PsbSサブユニットの存在に依存したエネルギー消失（qE）としてクロロフィル蛍光解析を通して検出可能である．qEによるTD（qE-TD）の生理学的重要性は広く理解されているものの，吸収された光エネルギーのどの程度がqE-TDへ分配されるかは明らかとなっていない．本研究では，RNAiによってPsbSの発現を抑制させたイネ形質転換体を用いて，光化学系IIに吸収された光エネルギーの分配を典型的なエネルギー分配モデルとして定量的に見積もった．PsbSの発現抑制によって，TDのうち光誘導される部分が減少した一方で，電子伝達に利用されるエネルギーは広範囲の光強度において変わりなかった．本研究におけるエネルギー分配モデルでは，飽和光下で30-50%がqE-TDに分配されていた．また，吸収された光エネルギーの大部分がqEに依存しない経路で熱放散されていることも明らかとなった．

光化学系IIに吸収された光エネルギーの熱放散への分配におけるPsbSサブユニットの有無の影響

石田　智*[1]，森田　健一*[1]，岸根　雅宏*[1], *[2]，高林　厚史*[1]，村上　怜子*[1]，竹田　恵美*[3]，島本　功*[4]
佐藤　文彦*[1]，遠藤　剛*[1]

*[1] 京都大学
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 大阪府立大学
*[4] 奈良先端科学技術大学院大学

日本食品科学工学会誌，58（12），591-596（2011）

LAMP法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別

岸根　雅宏，奥西　智哉

（独）農研機構食品総合研究所

LAMP法を用いた簡易で迅速なコシヒカリの識別技術を開発した．コシヒカリを検出するプライマー（陽性プライマー）およびコシヒカリを除く品種を検出するプライマー（陰性プライマー）は，いもち病抵抗性遺伝子であるPi5-1とその感受性対立遺伝子の配列を用いて作製した．陽性および陰性プライマーによる上位48品種の増幅解析の結果，両プライマーは，それぞれコシヒカリもしくはコシヒカリ以外の品種を約90%の確度で検出可能であることが示された．また，粒サンプルからの迅速な識別を目指し，水酸化ナトリウムを用いた極簡易DNA抽出法の開発も合わせて行った．簡易法で抽出したDNAは，キットで精製したDNAとほぼ同等のLAMP増幅を行うことが可能であった．これらの手法を組み合わせ，コシヒカリとひとめぼれ（コシヒカリ以外の品種の代表）間における試料混入の検出を試みた結果，どちらのプライマーも1％の混入から検出可能であることが示された．

Rapid Identification of Rice Cultivar “Koshihikari” Using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Masahiro Kishine, Tomoya Okunishi

National Food Research Institute, NARO

Applied Biochemistry and Biotechnology, 166 (7), 1781-1790 (2012)

Improved Ethanol and Reduced Xylitol Production from Glucose and Xylose Mixtures by the Mutant Strain of Candida shehatae ATCC 22984

Yuan Li, Jeung-yil Park, Riki Shiroma, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO

Candida shehatae ATCC 22984株からアンチマイシン A と2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム クロライドを用いたスクリーニングにより，キシロース及びグルコースの混合物を基質とした際のキシロース発酵性が優れた変異株Cs3512株を得た．本菌は，121.3 g/Lのキシロースから44.4 g/Lのエタノールを生産し，この値は親株の成績よりも13% 高いものであった．それと同時に，副産物であるキシリトール生産性は，親株の16.3 g/Lから10.2 g/Lにまで減少した．52.9 g/Lのグルコースと21.2 g/Lキシロースを含む混合液を用いた場合，親株では0.39 gエタノール/g糖質の収率だったのに対して，Cs3512株では0.42 gエタノール/g糖質まで上昇した．CaCCO法により水酸化カルシウムで前処理した稲わらをCs3512株により並行複発酵した結果，理論収率の77%のエタノールを生成した．このように，Cs3512株はリグノセルロース系バイオマスのエタノール変換に用いるための非組換え酵母としての潜在性が高いものと期待される．

Candida shehatae ATCC 22984の変異によるグルコース・キシロース混合物からのエタノール生産能の改良
およびキシリトール生産性の低下

李　　源，朴　　正一，城間　　力，池　　正和，徳安　　健

（独）農研機構　食品総合研究所

Biomass & Bioenergy, 35 (8), 3733-3735, 2011

Contents of various sources of glucose and fructose in rice straw, a potential feedstock for ethanol production in Japan

Jeung-yil Park*[1], Eiji Kanda*[2], Akira Fukushima*[2], Kota Motobayashi*[3], Kenji Nagata*[4], Motohiko Kondo*[5], Yasuo Ohshita*[6]
Satoshi Morita*[7], Ken Tokuyasu*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] National Agricultural Research Center for Tohoku Region, NARO
*[3] National Agricultural Research Center, NARO
*[4] National Agricultural Research Center for Western Region, NARO
*[5] National Institute of Crop Science, NARO
*[6] National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, NARO
*[7] National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

日本におけるバイオエタノール生産原料としての潜在性を評価するため，主要品種稲わら中の糖質成分について分析した．主要国産品種（14品種21検体）の成熟期収穫稲わらを試験試料とした．分析した全ての試料において，セルロースやキシランなどの細胞壁糖質に加え，易分解性糖質（グルコース，フルクトース，スクロース，澱粉，β-1,3-1,4-グルカン）も顕著量（62-303 g/kg）含まれていた．易分解性糖質と細胞壁リグノセルロース部の両方から発酵性糖質を豊富に得ることができることから，稲わらはエタノール生産原料として有用であることが示唆された．

日本においてエタノール生産の原料となり得る稲わら中のグルコース・フルクトース供給源の含有量

朴　　正一*[1]，神田　英司*[2]，福嶌　　陽*[2]，元林　浩太*[3]，長田　健二*[4]，近藤　始彦*[5]，大下　泰夫*[6]
森田　　敏*[7]，徳安　　健*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2]（独）農研機構　東北農業研究センター
*[3]（独）農研機構　中央農業総合研究センター
*[4]（独）農研機構　近畿中国四国農業研究センター
*[5]（独）農研機構　作物研究所
*[6]（独）農研機構　北海道農業研究センター
*[7]（独）農研機構　九州沖縄農業研究センター

Biomass & Bioenergy, 39, 120-127 (2012)

Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production

Sathaporn Srichuwong*[1], Takahiro Orikasa*[2], Junko Matsuki*[1], Takeo Shiina*[1], Tooru Kobayashi*[3], Ken Tokuyasu*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University
*[3] National Agricultural Research Center for Kyushu Region, NARO

新規開発されたカンショの九州159号を原料としたエタノール生産特性を，通常型のダイチノユメを用いたものと比較した．九州159号から得た澱粉の糊化温度は，49.2-66.2℃であったのに対して，ダイチノユメでは約20℃高い値（70.9-85.4℃）となった．九州159号の澱粉の糊化温度が低い理由は，短鎖長のアミロペクチン側鎖の比率が高いことに起因するものと考えられた．カンショ磨砕物（0.3 kg/Lより高密度のもの．）を酵素を用いた粘性低下によって調製し，液化および並行複発酵に供した後に，液化温度に対するエタノール生産性を評価した．その結果，九州159号では，液化温度60℃で十分なエタノール生産性を示し，15.1-15.4%(v/v)のエタノールを並行複発酵開始後48-72時間目に生産（理論収率の88.8-90.6%）した．それに対して，ダイチノユメでは，液化温度90℃とした条件で同様の成績となった．環境負荷を考慮した場合，九州159号ではダイチノユメを用いた場合と比較して，エネルギー消費及びCO_2排出量を約50%低減できるものと評価された．このように，九州159号を原料として用いることにより，エネルギー効率の高いエタノール生産技術が提供できるものと考えられる．

低温糊化澱粉を有するカンショはバイオエタノール製造原料として有望である

Sathaporn Srichuwong*[1]，折笠　貴寛*[2]，松木　順子*[1]，椎名　武夫*[1]，小林　　透*[3]，徳安　　健*[1]

*[1] (独) 農研機構食品総合研究所
*[2] 宮城大学食産業学部
*[3] (独) 農研機構　九州沖縄農業研究センター

Bioresource Technology, 102, 11183-11188, 2011

Efficient conversion of sugarcane stalks into ethanol employing low temperature alkali pretreatment method

Wu Long*[1], Yuan Li*[1], Mitsuhiro Arakane*[1], Masakazu Ike*[1], Masahisa Wada*[2], Yoshifumi Terajima*[3], Shoko Ishikawa*[4], Ken Tokuyasu*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo
*[3] Japan International Research Center for Agricultural Sciences
*[4] National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

サトウキビ茎部を原料としたバイオエタノール製造プロセスの評価を行った．本プロセスは，サトウキビ茎部搾汁後のバガスを，低温アルカリ（LTA）前処理及び酵素糖化を行って得られる糖液と，茎部搾汁液とを混合し，エタノール発酵を行うものである．2 kgのサトウキビ生茎を搾汁して得られたバガスについて，LTA前処理後，市販酵素製剤（セルラーゼ製剤及びβ-グルコシダーゼ製剤）によって糖化反応を行った．この時，比較的少量酵素での72時間糖化反応にて，前処理バガス中セルロースからのグルコース変換率は98%であった．糖化反応で得られた糖液と，サトウキビ茎部搾汁液とを混合し，Saccharomyces cerevisiae NBRC 0224を用いてエタノール発酵を行った結果，混合液中の発酵性糖質は速やかにエタノールに変換され，12時間で193.5 mlのエタノールが得られた．サトウキビ茎部の糖液とセルロース中のヘキソース総量から換算すると，88%のエタノール収率であった．本プロセスでは，茎部に含まれるヘキソース分のほぼ全量を利用し，効率的にエタノールに変換することが可能である．

低温アルカリ前処理法によるサトウキビ茎部の効果的エタノール転換

武　　龍*[1]，李　　源*[3]，荒金　光弘*[1]，池　　正和*[1]，和田　昌久*[2]，寺島　義文*[3]，石川　葉子*[4]，徳安　　健*[1]

*[1] (独) 農研機構食品総合研究所
*[2] 東京大学大学院農学生命科学研究科
*[3] (独) 国際農林水産業研究センター
*[4] (独) 農研機構　九州沖縄農業研究センター

Bioresource Technology, 102, 4793-4799, 2011

Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production

Wu Long*[1], Mitsuhiro Arakane*[1], Masakazu Ike*[1], Masahisa Wada*[2], Tomoyuki Takai*[3], Mitsuru Gau*[3], Ken Tokuyasu*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo
*[3] National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, NARO

我々は，エタノール製造において，リグノセルロースバイオマスの酵素糖化効率を向上する低温アルカリ（LTA）前処理法を提唱した．LTA前処理が，スウィートソルガムバガスの構造・組成及び酵素糖化性に与える効果について検討した．前処理により，僅かにグルカンを損失したものの，バガス中の大部分のリグニンとキシランが除去された．また，特定の前処理条件下において，セルロース結晶構造が変化した．処理したバガスの糖化性は格段に向上し，市販酵素（セルラーゼ製剤及びβ-グルコシダーゼ製剤）での24時間の糖化反応において98％のグルカン糖化率が達成された．また，BMR変異体バガスは，非BMR株と比較して前処理効果が高く，より高い酵素糖化性を得ることができた．

エタノール生産のためのスウィートソルガムバガス低温アルカリ前処理による酵素消化性向上

武　龍*[1]，荒金　光弘*[1]，池　正和*[1]，和田　昌久*[2]，高井　智之*[3]，我有　満*[3]，徳安　健*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 東京大学大学院農学生命科学研究科
*[3]（独）農研機構　九州沖縄農業研究センター

Bioresource Technology, 102, 6502-6507, 2011

DiSC (direct saccharification of culms) process for bioethanol production from rice straw

Jeung-yil Park*, Masakazu Ike*, Mitsuhiro Arakane*, Riki Shiroma*, Yuan Li*, Yumiko Arai-Sanoh**
Motohiko Kondo**, Ken Tokuyasu*

* National Food Research Institute, NARO
** National Institute of Crop Science, NARO

本研究では，易分解性糖質（SCs：グルコース，フルクトース，スクロース，澱粉，β-1,3-1,4-グルカン）を多く含む稲わら稈部を原料とした，エタノール製造DiSC（稈部直接糖化）法を構築した．本法は，SCs含有量が高い稲わら稈部を風力選別により分離・回収し，アミラーゼによる液化反応後，並行複発酵によりエタノール生産を行うものである．リーフスター（乾重あたりのヘキソース含量69.2％（SCs及びセルロース由来））を原料とした例では，風力選別によりSCs回収率83.1%で稈部濃縮画分が分離され（重量回収率54.1%），20%固形分濃度における稈部画分の液化・並行複発酵（24時間）を経て，5.6%（w/v）のエタノールを得た．本法は，SCsを多く含む稲わらから，熱・化学的前処理を行うことなく比較的高濃度のエタノール発酵液を得ることができることから，前処理や蒸留に係るコストの大幅低減に繋がる．

稲わらからのバイオエタノール生産のためのDiSC（稈部直接糖化）法

朴　正一*，池　正和*，荒金　光弘*，城間　力*，李　源*，荒井（三王）裕見子**，近藤　始彦**，徳安　健*

*（独）農研機構食品総合研究所
**（独）農研機構　作物研究所

International Journal of Food Science and Technology, 46 (12), 2628-2633 (2011)

Effect of debranching and heat-moisture treatment on the properties of Thai rice flours

Prajongwate Satmalee*, **, Junko Matsuki**

* Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Thailand
** National Food Research Institute, NARO

高アミロースおよび低アミロースのタイ米を用いて，米粉の難消化性澱粉（RS）含量の増加を試みた．プルラナーゼ処理および湿熱処理により米粉の粘度特性が変化し，剪断安定性が増加したことが示された．SEM観察から，米粉の外観には変化は認められなかった．本処理により，高アミロース米粉の緩消化性澱粉（SDS）含量は増加し，低アミロース米粉のRS含量は11.6%から18.3%まで増加した．澱粉の構造を保持しつつRSの増加と粘度特性の改善が可能であることが示された．

枝切りおよび湿熱処理がタイ米の米粉の澱粉特性に及ぼす影響

Prajongwate Satmalee*, **，松木　順子**

* タイ国カセタート大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Bioscience and Bioengineering, 111 (6), 682-686 (2011)

Bioethanol production from rice straw by a sequential use of Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis with heat inactivation of Saccharomyces cerevisiae cells prior to xylose fermentation

Yuan Li, Jeung-yil Park, Riki Shiroma, Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO

稲わらからの効率的バイオエタノール生産システムの構築に向けて，新たな発酵戦略を提案した．本戦略では，グルコースとキシロースの混合物をSaccharomyces cerevisiae（Sc）およびPichia stipitis（Ps）を順次添加する方法を提案しており，Psの添加前に熱処理を行いScを不活性化することを特徴とする．条件検討の結果，50℃で6時間のSc不活性化処理によって，高いキシロース発酵性が観察された．本法を適用した合成培地での発酵試験では，理論収率の85%の収率が得られた．同時に，副産物となるキシリトールの生成量が対照試験での値と比較して42.4%低減した．水酸化カルシウム前処理・炭酸ガス中和後の稲わらを用いた並行複発酵試験では，80時間でグルコースおよびキシロースが消失し，10%（w/w）の前処理稲わらを用いた結果，21.1 g/Lのエタノール（理論収率の72.5%）の生成を記録した．本法は，大規模での遺伝子組換え菌使用が制限させる地域でのリグノセルロース系エタノール生産に役立つものと期待される．

キシロース発酵前にSaccharomyces cerevisiaeを熱失活させることを特徴とする，Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia stipitisの連続使用による稲わらからのバイオエタノール製造

李　　源，朴　　正一，城間　　力，徳安　　健

（独）農研機構食品総合研究所

Starch/Stärke, 64 (6), 452-460 (2012)

Effect of lime treatment and subsequent carbonation on gelatinization and saccharification of starch granules

Junko Matsuki, Jeung-yil Park, Riki Shiroma, Masakazu Ike, Kazutaka Yamamoto, Ken Tokuyasu

National Food Research Institute, NARO

モデル物質としてイネ胚乳澱粉を用いて，水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉粒の糊化および糖化特性に及ぼす影響について解析した．水酸化カルシウムの濃度が上昇するに従い，DSC糊化温度は顕著に上昇し，糊化エンタルピーは減少した．カルシウムイオンの架橋によって澱粉粒が安定化するとともに，水素結合の切断が起きていると考えられた．この効果は水酸化カルシウム濃度９%程度で頭打ちとなった．穏やかな温度処理を施すことで，糊化は促進された．温度処理によって水素結合の切断が促進され，カルシウムイオンが結合できる水酸基が増加したと考えられた．水酸化カルシウム処理後に50℃24時間の温度処理を経て二酸化炭素中和をすることで，温度処理しないときに比べて糖化率を1.9倍まで上昇させることができた．澱粉と繊維質の共存する原料から効率的にグルコースを回収する際に応用できるものと期待される．

水酸化カルシウム処理および二酸化炭素中和が澱粉の糊化および糖化特性に及ぼす影響

松木　順子，朴　　正一，城間　　力，池　　正和，山本　和貴，徳安　　健

（独）農研機構食品総合研究所

農業施設，42（3），100-108（2011）

バイオエタノール蒸留廃液の成分特性と圃場還元利用のポテンシャル

谷　　昌幸*，加藤　　拓*，宮竹　史仁*，小池　正徳*，徳安　　健**

* 帯広畜産大学　地域環境学研究部門
** （独）農研機構　食品総合研究所

小麦，テンサイ，サトウキビ廃糖蜜からのバイオエタノール製造時に副生する蒸留廃液について，圃場還元による有効利用の可能性を検討するため，肥料成分，着色成分の解析，ポット試験による作物生産に及ぼす影響解析等を行った．肥料成分の濃度や質は原料の影響が強く反映された．蒸留廃液は易分解性有機物に富み土壌中で速やかに分解されたが，液体画分中の着色成分や溶存腐植物質は，原料や製法の影響を受けることが示唆された．ホウレンソウのポット試験では，化学肥料施肥区と比較して，地上部および地下部の乾燥重量，並びに地上部の抗酸化活性に大きな差は見られなかった．

Physico-Chemical Properties of Distillation Wastes from Bio-Ethanol Production and their Potential for Arable Land Application

Masayuki Tani*, Taku Kato*, Fumihito Miyatake*, Masanori Koike*, Ken Tokuyasu**

* Department of Agro-Environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
** National Food Research Institute, NARO

食品総合研究所報告，76，1-7（2012）

澱粉の糊化と酵素処理が米蛋白質の溶解性に与える影響

矢野　裕之*1, *2，竹内　正彦*3，加藤（江森）澄恵*4，我妻　義則*5，田口　計哉*6，岡澤　由晃*6
西澤　賢一*3，黒田　　秧*2, *7

*1（独）農研機構食品総合研究所
*2（独）農研機構作物研究所
*3（社）長野県農村工業研究所
*4 トキタ種苗株式会社
*5 わがつまこどもクリニック
*6 長野興農株式会社
*7（独）農研機構生物系特定産業技術研究支援センター

米デンプンの糊化と，その後のアミラーゼおよびプロテアーゼ処理が蛋白質の挙動に与える効果を解析した．前報では，米粉に加水・加熱し糊化させた後，アミラーゼ処理で液化した糖化液を遠心すると，上清には蛋白質がほとんど含まれないことを報告した．本研究では，糖化液をさらにプロテアーゼ処理し，遠心後の上清にやはり蛋白質がほとんど含まれないことをSDS-PAGEで確認した．また，糖化液に含まれる蛋白質の36％がアミノ酸として，アミノ酸とペプチドを併せると63％が上清に回収されることがわかった．本報は極低蛋白質・低アレルゲンでアミノ酸，糖類に富む食品原料を開発するための予備研究に位置づけられる．

Influence of starch gelatinization and the following enzymatic treatments on the solubility of rice protein

Hiroyuki Yano*1, *2, Masahiko Takeuchi*3, Sumie Kato-Emori*4, Yoshinori Wagatsuma*5, Keiya Taguchi*6, Yoshiaki Okazawa*6
Kenichi Nishizawa*3, Shigeru Kuroda*2, *7

*1 National Food Research Institute, NARO
*2 National Institute of Crop Science, NARO
*3 Agriculture and Technology Institute of Nagano Farmers
*4 Research Station, Tokita Seed Co., Ltd.
*5 Wagatsuma Pediatricand Allergy Clinic
*6 Nagano Kono Co., Ltd.
*7 Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, NARO

日本食品化学学会誌，18（2），103-109（2011）

イムノプロテオミクス手法を用いたソバIgE結合タンパク質の網羅的検出

佐藤　里絵*，中村　里香**，手島　玲子**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 国立医薬品食品衛生研究所

イムノプロテオミクスの手法を用いることにより，ソバに含まれるIgE結合タンパク質の網羅的検出（アレルゲノーム解析）を行った．ソバ種子より塩可溶性タンパク質を抽出し，一次元及び二次元電気泳動により分離した後，ソバアレルギー患者血清を用いたイムノブロットを行った．その結果，一次元イムノブロット解析により，数種類のIgE結合タンパク質の存在が示された．また，二次元電気泳動とプロテオミクスの手法を組み合わせたアレルゲノーム解析の結果，既知アレルゲンであるFag e 1や，新規IgE結合タンパク質を含む複数のスポットが検出された．検出されたスポットのうち，いくつかは新規な13Sグロブリンタンパク質サブユニットあるいはアイソフォームであった．また，ビシリン様タンパク質と相同性を持つスポットが検出されたことから，新規ビシリン様タンパク質の存在が示唆された．これらの結果から，今回のアレルゲノーム解析により得られた情報は，ソバの網羅的IgE結合タンパク質マップの構築に貢献するだけでなく，ソバの様々な品種におけるIgE結合タンパク質のバリエーションを検出する際にも有用であると期待できる．

Proteomic identification of IgE-binding proteins in buckwheat

Rie Satoh*, Rika Nakamura**, Reiko Teshima**

* National Food Research Institute, NARO
** National Institute of Health Sciences

Food Chemistry, 132 (2), 865-872 (2012)

Antioxidant behavior of carotenoids highly accumulated in HepG2 cells.

Irwandi JASWIR, Miyuki KOBAYASHI, Toshie KOYAMA, Eiichi KOTAKE-NARA, Akihiko NAGAO

National Food Research Institute, NARO

主要な食品カロテノイドについて，HepG2ヒト肝細胞内に高濃度で集積した状況下における抗酸化挙動をα-トコフェロールと比較検討した．報告されているヒト肝臓の蓄積量より高い濃度でカロテノイドとα-トコフェロールを細胞内に蓄積させ，tert-ブチルヒドロペルオキシドに暴露し酸化ストレスを負荷した．β-カロテン（>2.6 nmol/mgタンパク）とアスタキサンチン（>1.8 nmol/mgタンパク）は有意に脂質過酸化を抑制したが，β-クリプトキサンチンとルテインは抑制しなかった．α-トコフェロールは顕著に脂質過酸化を抑制し，そのIC50値は0.16 nmol/mgタンパクであった．リコペン以外のカロテノイド及びα-トコフェロールは高濃度領域においてプロオキシダント作用を示さなかった．細胞内でのカロテノイドの抗酸化挙動はリポソームや均一溶液系で報告されているものとは顕著に異なっていた．培養細胞で見いだされた抗酸化挙動がヒトの健康へどのような関わりがあるかについては今後の研究が必要であろう．

HepG2細胞内に集積した高濃度カロテノイドの抗酸化挙動

Irwandi JASWIR，小林みゆき，小山　寿恵，長尾　昭彦

（独）農研機構食品総合研究所

食品総合研究所研究報告，76，59-66（2012）

食品害虫サイトの大幅改訂による訪問者のアクセス行動の変化

曲山　幸生，七里　与子，宮ノ下明大，今村　太郎，和田　有史，増田　知尋

（独）農研機構食品総合研究所

2010年６月から３か月間実施したウェブアンケートの結果を受けて，2010年11月に食品害虫サイトを大幅に改訂した．この改訂では，各ページに共通メニューを設け，訪問者が食品害虫サイトに存在する情報を見つけやすくした．また，ページごとに関連情報へのリンクを設けて，訪問者が興味を持ちそうな情報が他にもあることを示した．この改訂の前後でアクセス解析結果を比較したところ，図鑑から他のページへ誘導される訪問者が増加し，図鑑以外のページの閲覧数が増えていた．この結果から，食品害虫サイトの利便性が向上し，図鑑以外の有用な情報を掲載したページの存在に気づきやすくなったと考えられる．また，検索キーワードに図鑑関係以外の単語も現れてきているので，改訂後の食品害虫サイトは図鑑への依存度が低下してきたと考えられる．

Changes in Access Behavior of Visitors to Food-Insect Site after a Large Revision

Yukio Magariyama, Kumiko Shichiri, Akihiro Miyanoshita, Taro Imamura, Yuji Wada, and Tomohiro Masuda

National Food Research Institute, NARO

Biocontrol Science 16 (2), 79-83 (2011)

Decontamination Effect of Milling by Jet Mill on Bacterium in Rice Flour

Itaru Sotome, Daisuke Nei, Masuko Tsuda, Mohammed Sharif Hossen, Makiko Takenaka, Hiroshi Okadome, Seiichiro Isobe

National Food Research Institute, NARO

ジェットミルにより粉砕された米粉の一般生菌数を測定した．平均粒径が100から３umへと小さくなるにしたがい，米粉中の一般生菌数は減少し，原料米粒中の菌数が玄米および精米でそれぞれ約６および5 Log10 CFU/gであったものが，平均粒径３umの米粉では約４および３Log10 CFU/gに減少した．粉砕中に試料が受けた温度および圧力変化は小さく微生物の生存に影響を及ぼしていないと考えられ，米粉中の生菌数は粉砕後の分級などにより減少した可能性があると考えられた．

ジェットミルによる粉砕工程の米粉中の細菌に対する除染効果

五月　女格，根井　大介，津田　升子，モハメド・シャリフ・ホッセン，竹中真紀子，岡留　博司，五十部誠一郎

（独）農研機構食品総合研究所

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 75 (7), 1240-1244 (2011)

Identification of 2,4-dihydroxy-2,5-dimethyl-3 (2H) -thiophenone as a low-molecular-weight yellow pigment in soy sauce

Miki Satoh*, Yuri Nomi*, Masatsune Murata*, Shinji Yamada*, Makiko Takenaka**, Hiroshi Ono**

* Ochanomizu Univercity
** National Food Research Institute, NARO

醤油の色は主にMaillard反応によって生成したメラノイジンによると考えられる．しかし，メラノイジンは高分子量の不均一なポリマーであるため，メラノイジンの化学構造は解明できない．著者らは醤油から低分子量の色素を単離し，醤油の色全体に対するその寄与は極めて低いが，2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3（2H）-チオフェンをMaillard反応によって生成したこの色素として同定した.

醤油の低分子量黄色色素としての2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェンの同定

佐藤　美紀*，能見　祐理*，村田　容常*，山田　真司*，竹中真紀子**，小野　裕嗣**

* お茶の水女子大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Japan Journal of Food Engineering（日本食品工学会誌），12（1），29-35（2011）

Effect of Particle Size of Different Crop Starches and Their Flours on Pasting Properties

Md. Sharif Hossen*, **, Itaru Sotome*, Makiko Takenaka*, Seiichiro Isobe*, **, Mitsutoshi Nakajima*, **, and Hiroshi Okadome*

* National Food Research Institute, NARO
** Graduate school of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では微粉砕が米，小麦，トウモロコシ，馬鈴薯，甘藷及びキャッサバ等デンプンの糊化特性に与える影響を明らかにした．微粉砕前では粒子の平均粒径やデンプンの糊化特性は作物によって異なった．しかし，微粉砕回数の増加とともに粉末の平均粒径は全ての作物で減少し（10μm未満），それらの粉末は類似の糊化特性を示した．また大きいデンプン粒を含む市販の粉末ほど微粉砕後では損傷デンプンの割合が高かった.

The effect of particle size reduction on the pasting properties of rice, wheat, corn (maize), potato, sweet potato, and cassava starches was elucidated. Before pulverizing, the mean particle size and the pasting properties of the starches differed by crop. With increased pulverizing, the mean particle size decreased in all flours (to <10 μm) and the pasting properties converged. Commercial flours containing the larger starch granules have the higher starch damage after pulverization.

Md. シェリフ・ホッセン*，五月　女格*，竹中真紀子*，中嶋　光敏*, **，五十部誠一郎*, **，岡留　博司*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 筑波大学大学院生命環境科学研究科

Phytotherapy Research,

Bile acid-binding ability of Kaki-tannin from young fruits of persimmon in vitro and in vivo

Kenji Matsumoto*[1], Shinichiro Yokoyama*[2], Akio Kadowaki*[3], Natsumi Ozaki*[3], Nobuki Gato*[3], Makiko Takenaka*[4], Hiroshi Ono*[4]

*[1] Ishikawa Prefectural Univercity
*[2] Gifu Prefectural Research Institute for Bioengineering
*[3] Nakano BC Co. Ltd.
*[4] National Food Research Institute, NARO

柿未成熟果の胆汁酸結合能について調べた．高脂肪食と柿未成熟果乾燥粉末を10週間与えられたマウスは有意に胆汁酸排泄が促進され，中性脂肪と血漿コレステロール濃度が下がった．また，in vitroでの柿未成熟果の胆汁酸結合能測定では，100-2000 μMの胆汁酸水溶液において１％の柿未成熟果乾燥粉末は約60％の胆汁酸を吸着したのに対し，柿成熟果は約20％の胆汁酸を吸着した．柿未成熟果から得られた粗タンニン抽出物は54.7％のタンニンを含んでおり，2000 μMの胆汁酸水溶液において約78％の胆汁酸を吸着した.

in vivoとin vitroにおける柿の未熟果由来の柿タンニンの胆汁酸結合能

松本　健治*[1]，横山慎一郎*[2]，門脇　昭夫*[3]，尾崎なつみ*[3]，我藤　伸樹*[3]，竹中真紀子*[4]，小野　裕嗣*[4]

*[1] 石川県立大学
*[2] 岐阜県生物工学研究所
*[3] 中野BC株式会社
*[4]（独）農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌，58（11），537-541（2011）

ヤーコンの16品種・系統間のポリフェノール含有量等の特性評価

竹中真紀子*，七山　和子*，井上　栄一**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 茨城大学　農学部

ヤーコンの品種・系統間の各種特性を比較し，健康増進への寄与が期待できる食品として有望な品種・系統を見出すことを目的として，２カ年分の３品種および13系統のヤーコンの塊根および塊茎に含まれるポリフェノール化合物の含有量を中心に各種特性を評価した．３品種のうち‘サラダオトメ’および‘サラダオカメ’は塊根のポリフェノール含有量が多かった．16品種・系統のうち‘ペルー１’，‘ペルー３’および‘ペルー４’は特に塊茎のポリフェノール含有量が多く，‘CIP205029’は糖含量が最も多かった．ヤーコンの同一品種・系統の塊根および塊茎のポリフェノール含有量には正の相関が認められた．

Evaluation of Polyphenol Content and Other Properties of 16 Cultivars/Strains of Yacon

Makiko Takenaka*, Kazuko Nanayama* and Eiichi Inoue**

* National Food Research Institute, NARO
** Ibaraki University

Food Science and Technology Research, 18 (1), 7-15, 2012

Application of nanofiltration to recover benzoic acid from cranberry juice

Dat Quoc LAI*[1,*2], Nobuhiro TAGASHIRA*[3], Shoji HAGIWARA*[1], Mitsutoshi NAKAJIMA*[4]
Toshinori KIMURA*[2] and Hiroshi NABETANI*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Graduate School of Agricultural Science, Hokkaido University
*[3] Aohata Corporation
*[4] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

クランベリー・果汁に含まれる余剰の安息香酸をナノろ過による回収の可能性を検討した．
まず，ナノろ過膜のスクリーニングとして，市販のナノろ過膜を使用してクランベリー果汁の安息香酸と他の成分（糖類，有機酸）の阻止率を調査した結果，HC50，NFT50，G5，Desal-DK，DRA4510，UTC60とNTR7250を含む７種類の膜が有効であった．
これらの膜では安息香酸と他の成分（糖類，他の有機酸（クエン酸，リンゴ酸とキナ酸）とアントシアニン）の阻止率には40%以上の差があり，クランベリー果汁から安息香酸の分離ができる可能性が示された．さらに，供給液のpHを調整した際のろ過特性も評価した．pHを4.5に調整すると，安息香酸の阻止率は負となり，ナノろ過膜を選択的に透過することが明らかになった．
以上より，クランベリー果汁からナノろ過膜を使用して安息香酸を選択的に分離できることが示された．

ナノろ過膜のクランベリー果汁からの安息香酸の回収への応用

ライ・クオック・ダット*[1,*2]，田頭　伸洋*[3]，萩原　昌司*[1]，中嶋　光敏*[4]，木村　俊則*[2]，鍋谷　浩志*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 北海道大学大学院農学院
*[3] アオハタ株式会社
*[4] 筑波大学生命環境科学研究科

日本食品科学工学会誌，58（5），208-215（2011）

活性酸素種によるDNA分子切断と食物由来の天然抗酸化剤によるその制御作用

高橋　真介*,**，柳内　延也*,**，塩谷　茂信*,**，遠藤　準也**，萩原　昌司*，鍋谷　浩志*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 東海物産株式会社

次亜塩素酸ラジカル，水酸化ラジカルおよび過酸化亜硝酸ラジカルに過酸化水素を加えた４種の活性酸素種（ROS）に対する食品由来の各種天然抗酸化剤の抗参加活性を，DNA分解抑制作用を指標として評価した．次亜塩素酸ラジカルに対しては，チキンエキスから得られたイミダゾールジペプチドであるアンセリン−カルノシンが，水酸化ラジカルに対してはフェルラ酸が，そして過酸化亜硝酸ラジカルに対してはビタミンCとイミダゾールジペプチドが高い抗酸化性をしました．また，過酸化水素に対しては試験した抗酸化剤の中ではイミダゾールジペプチドが最も高い抗酸化性を示した．

The degradation of DNA molecules by reactive oxygen species and the protective activity of naturally occurring antioxidants drived from foods

Masayoshi Takahashi*,**, Nobuya Yanai*,**, Shigenobu Shiotani*,**, Jyunya Endo**, Shoji Hagiwara*, Hiroshi Nabetani*

* National Food Research Institute, NARO
** Tokai Bussan Co. Ltd.

Biotechnology Progress, 27 (6), 1785-1792 (2011)

The potential of spatially resolved spectroscopy for monitoring angiogenesis in the chorioallantoic membrane

Eva Verhoelst*[1], Flip Bamelis*[1], Bart De Ketelaere*[1], Nghia Nguyen Do Trong*[1]
Josse De Baerdemaeker*[1], Wouter Saeys*[1], Mizuki Tsuta*[2], Eddy Decuypere*[3]

*[1] BIOSYST -MeBioS K. U. Leuven, Belgium, *[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] BIOSYST -Livestock-Nutrition-Quality, K. U. Leuven, Belgium

本研究では，ニワトリ絨毛尿膜の変化を非破壊でモニタリングする手法の検討を行った．空間分解分光装置を構築し，これを用いて抱卵時間や炭素過剰及び通常条件の違いが血管新生に及ぼす影響の計測を試みた．胎生期10，13，16日目にニワトリ絨毛尿膜を直接計測し，その反射スペクトルを得た．その結果，血液の特徴的なスペクトルパターンが観察され，胎生期が進むにつれ血液量が増加すること，また反射スペクトルが光源-検出器距離の違いによって有意に異なることが明らかとなった．しかしながら，炭素過剰及び通常条件下で抱卵した試料に有意な差は観察されなかった．

空間分解分光法によるニワトリ絨毛尿膜における血管新生モニタリングの可能性

ヴァーホルスト・エヴァ*[1]，バメイユ・フリップ*[1]，デ ケートラール・バート*[1]，ングエン・ド・トロング ンギャ*[1]
デ・バエルデマエカー・ジョス*[1]，サイズ・ウォーター*[1]，蔦　瑞樹*[2]，デキュイペール・エディ*[3]

[1] ルーヴェンカトリック大学　メビオス部門（ベルギー），[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] ルーヴェンカトリック大学　家畜栄養品質部門（ベルギー）

Biotechnology Progress, 75 (7), 1312-1316 (2011)

Predicting the buckwheat flour ratio for commercial dried buckwheat noodles based on the fluorescence fingerprint

Mario Shibata*[1], Kaori Fujita*[1], Junichi Sugiyama*[1], Mizuki Tsuta*[1], Mito Kokawa*[2], Yoshitane Mori*[3], Hiroshi Sakabe*[3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
*[3] Food and Agricultural Materials Inspection Center

蛍光指紋とPLS回帰分析を用いて迅速にそば乾麺のそば粉割合を推定する手法を開発した．
蛍光指紋データとそば粉実測値データにPLS回帰を適用して得られたキャリブレーションモデルをバリデーションセットに適用した結果，バリデーションセットの当てはまりはR二乗値＝0.78，SEP＝12.4％であった．さらに添加物を含むサンプルを除外してより当てはまりの良いモデルを探索したところ，酢，緑茶，海藻，増粘多糖類および山芋を含むサンプルを除外したモデルがR二乗値＝0.84，SEP＝10.4％とバリデーションセットに対して最も当てはまりが良かった．このことは，当てはまりの良いキャリブレーションモデルは，サンプル組成が類似したデータセットを用いて構築した場合に得られることを示していると考えられた．本手法は複雑な前処理が必要なく，少量のサンプルで迅速な計測が可能であることから食品産業への応用が期待される．

蛍光指紋による市販そば乾麺のそば粉割合推定

柴田真理朗*[1]，藤田かおり*[1]，杉山　純一*[1]，蔦　瑞樹*[1]，粉川　美踏*[2]，森　良種*[3]，坂部　寛*[3]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 東京大学大学院農学生命科学研究科
*[3] 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部横浜事務所

Journal of Food Engineering,105 (4), 617-624 (2011)

Prediction of optimal cooking time for boiled potatoes by hyperspectral imaging

Nghia Nguyen Do Trong*, Mizuki Tsuta**, Bart M. Nicolaï *, Josse De Baerdemaeker*, Wouter Saeys*

* BIOSYST -MeBioS K. U. Leuven, Belgium
** National Food Research Institute, NARO

本研究では，400−1000 nmにおけるハイパースペクトルイメージング，ケモメトリクスおよび画像解析の組み合わせによる，ジャガイモの調理境界の非接触検出の可能性を検討した．部分最小二乗判別分析により，未調理および調理済みの領域における反射スペクトルを判別した．次に，画像解析により，部分最小二乗判別により得られた画像における調理境界を検出した．調理境界を検出した画像から，未調理領域のジャガイモ断面全体に占める割合を算出した．最後に，調理時間と未調理領域割合の関係をモデル化し，最適な調理時間を推定した．本研究の結果より，ハイパースペクトルイメージングによるジャガイモ調理業界における工程モニタリングの可能性が示唆された．

ハイパースペクトルイメージングによるゆでジャガイモの最適調理時間推定

ングエン・ド・トロング・ンギャ*，蔦　瑞樹**，ニコライ・バート*，デ・バエルデマエカー・ジョス*，サイズ・ウォーター*

* ルーヴェンカトリック大学　メビオス部門（ベルギー）
**（独）農研機構食品総合研究所

日本食品科学工学会誌，58（5），196-201（2011）

粥状に糊化処理した米を添加したパンの粘弾性および気泡構造

柴田真理朗*，杉山　純一*，蔡　　佳瓴*，蔦　　瑞樹*，藤田かおり*，粉川　美踏**，荒木　徹也**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 東京大学大学院農学生命科学研究科

糊化させた米のパンの品質への影響を評価するため，小麦粉パン，米粉パンに加え，糊化させた米粉を添加したパン（糊化米粉パン），お粥を加えたパン（お粥パン）を調製し，それぞれの形状，粘弾性係数，および気泡パラメータを計測した.
(1) お粥パンが最も膨張し，糊化米粉パンも小麦粉と同等に膨張したことから，糊化処理した米の添加によってパンの膨張が促進されることが分かった.
(2) 糊化させた米を添加したパンは，小麦粉，米粉パンより粘弾性が低い，つまり柔らかいことがわかった.
(3) 4種類のパン試料の気泡構造は同一であったことから，粘弾性の差は気泡壁（固相）の違いに依るものと推察された.
以上より，糊化処理をした米粉または米の配合が15％の場合，グルテンなどの品質改良剤や，特別な前処理なしで従来の小麦粉100％のパン，または米粉パンより膨張性が良く，柔らかい食感を持つパンを調製することが可能であることが確認された.

Viscoelastic Properties and Air-bubble Structure of Bread Containing Gelatinized Rice Porridge

Mario Shibata*, Junichi Sugiyama*, C. L. Tsai**, Mizuki Tsuta*, Kaori Fujita*, Mito Kokawa*, Tetsuya Araki**

* National Food Research Institute, NARO
** Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

---

日本食品科学工学会誌，58（8），375-381（2011）

蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測

藤田かおり，蔦　　瑞樹，杉山　純一，久城　真代，柴田真理朗

（独）農研機構食品総合研究所

蛍光指紋を用いて人工的にFusarium感染させた小麦を粉砕した小麦粉中のデオキシニバレノール（DON）濃度の推定を行った. DON濃度の推定式作成にはPLS回帰分析を用い，小麦粉の蛍光指紋からDON濃度を推定する回帰式を作成した.（1）キャリブレーション群およびバリデーション群における推定精度は決定係数R2＝0.990とR2＝0.983であり，残差もSEC＝1.1 ppm，SEP＝1.4 ppmと大きくは異ならなかった.（2）キャリブレーション群におけるPLS回帰係数の絶対値は，励起波長240−400 nm/蛍光波長500−600 nmの波長範囲において比較的大きいことから，上記波長条件がDON濃度推定に寄与していると推定された.（3）DON検知には迅速性が求められるため，計測時間の短縮を目的に上記波長条件における蛍光指紋のみにPLS回帰を適用した. その結果バリデーションデータの推定精度は，R2＝0.977，SEP＝1.6と全波長条件を用いた場合と大きく変わらず推定可能であることが明らかとなった. 以上のことから，蛍光指紋により，迅速かつ非破壊で小麦粉のDON濃度の推定が可能であることが示された.

Non-destructive Measurement of Deoxynivalenol in Wheat Flour Using Fluorescence Fingerprinting

Kaori Fujita, Mizuki Tsuta, Junichi Sugiyama, Masayo Kushiro, Mario Shibata

National Food Research Institute, NARO

Biotechnology and Biochemistry, 75 (11), 2112-2118 (2011)

Visualization of gluten and starch distributions in dough by fluorescence fingerprint imaging

Mito Kokawa*, **, Kaori Fujita**, Junichi Sugiyama**, Mizuki Tsuta**, Mario Shibata**, Tetsuya Araki*, Hiroshi Nabetani*, **

* Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
** National Food Research Institute, NARO

本研究では，蛍光指紋測定とイメージング技術を組み合わせた新たな手法を開発し，染色等の前処理を行わずに小麦粉生地中のグルテンとデンプン分布を可視化することに成功した. 蛍光指紋を構成する63の波長条件を用いて小麦粉生地，グルテン，およびデンプンの薄片化試料を撮像し，各画素の蛍光指紋データを得た. 小麦粉生地画像における各画素の蛍光指紋と，グルテンまたはデンプンの蛍光指紋のコサイン類似度を計算し，コサイン類似度の値に応じて各画素を色付けすることにより，グルテンおよびデンプンの分布を示す疑似カラー画像を得た. また，本手法による可視化結果と同サンプルを蛍光染色した結果を比較したところ，類似した分布パターンが見られ，可視化手法の妥当性が示された. 本手法は食品工学分野以外にも応用が期待される.

蛍光指紋イメージングによる小麦粉生地中のグルテン・デンプン分布の可視化

粉川　美踏*,**，藤田かおり**，杉山　純一**，蔦　　瑞樹**，柴田真理朗**，荒木　徹也*，鍋谷　浩志*,**

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Cereal Science, 55, 15-21 (2012)

Quantification of the distributions of gluten, starch and air bubbles in dough at different mixing stages by fluorescence fingerprint imaging

Mito Kokawa*, **, Kaori Fujita**, Jun'ichi Sugiyama**, Mizuki Tsuta**, Mario Shibata**, Tetsuya Araki*, Hiroshi Nabetani*, **

* Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
** National Food Research Institute, NARO

蛍光指紋測定とイメージング技術を組み合わせた可視化手法を開発し，小麦粉生地中のグルテンとデンプンの分布を可視化した．小麦粉生地は，ミキシング不足，最適ミキシング，ミキシング過剰，の３段階のものを用意した．蛍光指紋を構成するすべての波長条件にて，３段階の試料の蛍光画像を取得し，各画素の蛍光指紋に対して，グルテンとの類似度，及び，デンプンとの類似度に応じた色を当てはめた．さらに，気泡に当たる部分を黒色でマスキングした．結果として得られた画像では，グルテン，デンプン，及び，気泡の分布が見られた．各ミキシング段階につき，グルテンとデンプンの分布の均一さ，及び，気泡領域に関するパラメータを抽出し，ミキシングに伴いグルテンとデンプンの分布が均一になること，気泡の量が増えることを示した．

蛍光指紋イメージングによる異なるミキシング段階における小麦粉生地中のグルテン・デンプン・気泡分布の可視化と定量

粉川　美踏*,**，藤田かおり**，杉山　純一**，蔦　　瑞樹**，柴田真理朗**，荒木　徹也*，鍋谷　浩志*,**

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
**（独）農研機構食品総合研究所

Analytical Sciences, 28 (1), 61-64 (2012)

Gold nanoparticles as localization markers for direct and live imaging of particle absorption through a caco-2 cell monolayer using dark-field microscopy.

Toshiro Kobori*, Jun Watanabe*, Hidenobu Nakao**

* National Food Research Institute, NARO
** National Institute for Materials Science

近年，食品素材の腸管吸収効率を向上させることを目的として食品の超微細化が試みられているものの，その多くについては吸収機構が明らかになっていない．そこで本論文では，微細粒子と腸管細胞の相互作用を解析するため，暗視野顕微鏡を用いた生細胞観察技術を開発した．散乱強度の強い金粒子を用いることにより腸管モデルであるCaco-2細胞の相互作用を非染色，生細胞で可視化する条件を最適化した．これにより，金粒子を食品微細粒子に内包することにより光学限界よりも小さな粒子であっても直接可視化できる可能性が示唆された．

金粒子をマーカーとした暗視野顕微鏡によるCaco-2生細胞－粒子間相互作用のイメージング

小堀　俊郎*，渡辺　　純*，中尾　秀信**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 物質・材料研究機構

Biochemistry, 51 (1), 32-42

Evaluation of Temperature Effect on the Interaction between β-Lactoglobulin and Anti-β-lactoglobulin Antibody by Atomic Force Microscopy

Jun'ichi Wakayama, Shigeru Sugiyama

National Food Research Institute, NARO

抗体抗原相互作用のような分子識別は，動力学のパラメーターおよびエネルギーランドスケープにより規定される．そこで，異なる温度において，原子間力顕微鏡（AFM）を使用し，25度，35度，45度において実験を行った．その結果，以下の情報が得られた．（1）アンバインディング力は温度が上昇するにつれて減少した．（2）それぞれの温度で，解離プロセスにおいて，β-lactoglobulin-antibody complex では少なくとも２つのエネルギーバリアが存在する．（3）温度の上昇とともに，解離速度は温度が上昇するにつれて増大した．

若山　純一，杉山　　滋

（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Food Science, 77 (1), N2-N7 (2011)

Ultrastructural Analysis of Buckwheat Starch Components Using Atomic Force Microscopy

Suresh Neethirajan*, Kazumi Tsukamoto**, Hiroko Kanahara**, Shigeru Sugiyama**

* University of Gulf
** National Food Research Institute, NARO

ソバのデンプン粒子を原子間力顕微鏡と動的光散乱を使用して解析した．部分的に消化した澱粉粒子では中心にコアを有する極めて明瞭な成長リング状が観察された．また，原子間力顕微鏡と動的光散乱による解析詳細な解析では，ソバ澱粉は多角形であり，直径は2～19 μmであった．さらに，酸加水分解によって球状の120から200 μmの長さで，直径が４から30 nmのナノクリスタルも構造が観察された．

Suresh Neethirajan*，塚本　和己**，金原　浩子**，杉山　　滋**

* グエルフ大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Microscopy and Microanalysis, 17 (4) (2011)

Karyotype Analysis of Buckwheat Using Atomic Force Microscopy

Suresh Neethirajan*, Tamaki Hirose**, Junichi Wakayama**, Kazumi Tsukamoto**, Hiroko Kanahara** and Shigeru Sugiyama**

* University of Guelph
** National Food Research Institute, NARO

原子間力顕微鏡（AFM）により普通ソバ（F. esculentum）及びダッタンソバ（F. tartaricum）の核系判別を行った．ダッタンソバの染色体は，根端の細胞を採取しサンプルとした.乾燥させた普通ソバ及びダッタンソバの高さは，それぞれ350 nm及び150 nmであった．普通ソバ及びダッタンソバのメタフェーズセットの容積の推定は，３次元 AFM測定により行った．その計算の結果，普通ソバにおいては1.08-2.09 μm^3，ダッタンソバでは0.49-0.78 μm^3であった．

Suresh Neethirajan*，廣瀬　玉紀**，若山　純一**，塚本　和己**，金原　浩子**，杉山　　滋**

* グエルフ大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Scanning 34, 186-190 (2012)

Karyotyping of Barley Chromosomes by a New Fluorescence Banding Technique Combined with Scanning Probe Microscopy

Shigeru Sugiyama*, Tomoyuki Yosino**, Tamaki Hirose*, Toshio Ohtani*

* National Food Research Institute, NARO
** Hiroshima Prefectural University

オオムギは，７つの染色体を持つが，そのうちの４つがほぼ同じサイズであり，判別が極めて困難であった．そこで，蛍光バンド法は，染色体の判別において良く使われる手法であるが，オオムギ染色体においては，これまで適用されてこなかった．そこで，本研究では，染色体を暖かい酢酸溶液で処理し，その後，YOYO-1による染色を行ったところ，それぞれの染色体に特徴的な蛍光バンドが現れ，すべてのオオムギ染色体の判別を簡便に行うことができた．蛍光染色した染色体の表面を原子間力顕微鏡で走査したところ，蛍光バンド部位は概ね平坦であった．即ち，このことは，それぞれの染色体において内部DNAの密度がほぼ同等であることを示唆するものかもしれない．

新規蛍光バンド法と走査型プローブ顕微鏡の組み合わせにによるオオムギ染色体の核径判別

杉山　　滋*，吉野　智之**，廣瀬　玉紀*，大谷　敏郎*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 県立広島大学

Biomass & Bioenergy, 37, 188-195 (2012)

A techno-economic and environmental evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straw by RT-CaCCO process

Poritosh Roy*, Ken Tokuyasu*, Takahiro Orikasa**, Nobutaka Nakamura*, Takeo Shiina*

* National Food Research Institute, NARO
** School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University

ライフサイクルアセスメント手法を用いて，コシヒカリの稲わらからの酵素糖化法によるバイオエタノール（BE）生産について解析した．３つのシナリオを設定し，日本国内での稲わらからのBE生産について，純エネルギー使用量（NEC），CO_2排出量，コストを指標として解析し，BEの環境負荷の低減効果，経済性を評価した．３つのシナリオに基づく解析の結果，NECは10.43～11.56 GJ/m^3，CO_2排出量は1106.34～1144.94 kg/L-Ethanol，88.54～137.55 千円／m^3と試算された．BE生産にかかわる技術革新と再生可能エネルギー導入促進施策の充実は，BE生産による環境負荷低減効果の拡大と低コスト化において不可欠であると考えられた．

RT-CACCO法による稲わらからのバイオエタノール生産に関する技術経済的および環境影響に関する評価

Poritosh Roy*，徳安　　健*，折笠　貴寛**，中村　宣貴*，椎名　武夫*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 宮城大学食産業学部

Colloids and Surfaces A: physicochemical and Engineering Aspect, 361, 31-37 (2010)

Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water

Fernanda Yumi Ushikubo*, Takuro Furukawa*, Ryou Nakagawa*, Masatoshi Enari*, Yoshio Makino*, Yoshinori Kawagoe*
Takeo Shiina**, Seiichi Oshita*

* Graduate School of Agriculture, University of Tokyo
** National Food Research Institute, NARO

動的光散乱によりバブル処理水を観察したところ，バブル処理に純酸素ガスを用いた場合には数日間，空気を用いた場合には１時間未満，それぞれナノ粒子の存在が確認された．マンガンイオン含有条件でマイクロ・ナノバブルを導入した水をNMRにより観察したところ，スピン－格子緩和時間が延長され，マンガンイオンを吸着する気液界面が存在することを示した．また，バブル処理水のζポテンシャル測定の結果，酸素マイクロ・ナノバブル導入水では－45～－34m V，空気バブル導入水では－20～17mVであり，酸素マイクロ・ナノバブル処理水では安定的な荷電粒子が存在することを示した．これらの結果から，酸素マイクロ・ナノバブル処理水では，数日間にわたって安定的なナノバブルが存在する可能性が高いと考えられた．

水中におけるナノバブルの存在証左と安定性

フェルナンダ・ユミ・ウシクボ*，古川　琢郎*，中川　　亮*，江成　雅俊*，牧野　義雄*，川越　義則*
椎名　武夫**，大下　誠一*

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
**（独）農研機構食品総合研究所

Food Preservation Science, 37 (6), 273-282 (2011)

Influence of impact stress on the postharvest physiological and chemical properties of cabbage heads

Manasikan Thammawong*, Tomoko Kaneta*, Nobutaka Nakamura*, Makoto Yoshida**, Ayaka Soga**, Takeo Shiina*

* National Food Research Institute, NARO
** Kanagawa Agricultural Technology Center

バルクでの荷扱いを想定し，物理的ストレスのうちの落下衝撃が，キャベツの生理的，化学的特性に及ぼす影響について検討した．適期収穫したキャベツを，10，20，40，80 cmの高さから水平コンクリート床に自由落下させ，その後，20℃に6日間保存し，保存中の呼吸速度，糖含量（スクロース，グルコース，フラクトース，およびそれらの合計としての全糖）を経時的に測定した．キャベツの呼吸速度は，落下処理直後に上昇し，その程度は，落下高さが大きいほど顕著であった．その後，呼吸速度は低下し，落下処理1日後には，対照区（落下処理無し）のそれとの間に，有意な差は見られなくなった．フラクトースと全糖は，保存1，3日後にやや低下し，6日後には顕著な低下が見られ，80 cm，40 cmから落下処理したキャベツで最も低い値を示した．すなわち，落下処理による生理的，化学的な影響として，呼吸速度の上昇と，糖含量の低下があることが示された．一方，落下処理後に，20℃，CA環境下に保存したキャベツにおいては，呼吸速度の上昇と糖含量の減少が抑制されたことから，CA環境条件によって落下ストレスによる生理的な損傷が低減されるものと考えられた．以上の結果から，収穫後のキャベツにおいて，落下処理は，処理直後の呼吸速度の上昇と，保存中の糖含量の減少を引き起こすこと，その影響が落下高さに依存すること，さらに，CA環境を含めた適切な環境の維持によりストレスの軽減と品質劣化の抑制が可能であることが示された．

衝撃ストレスが収穫後キャベツの生理的・化学的特性に及ぼす影響

Manasikan Thammawong*，兼田　朋子*，中村　宣貴*，吉田　　誠**，曽我　綾香**，椎名　武夫*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 神奈川県農業技術センター

Household and Personal Care today, n2/2011, 13-15 (2011)

Evaluation of a novel soybean oil-based surfactant for fine emulsion preparation

Qingyi Xu*[1], Mitsutoshi Nakajima*[2], Zengshe Liu*[3], Nobutaka Nakamura*[1], Takeo Shiina*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
*[3] NCAUR/ARS/USDA

大豆油由来界面活性剤による，微細エマルション作製について検討した．大豆油をエポキシ化することで得られたPorazengs R-004は，水中油滴（O/W型）微細エマルションの作製と安定化に極めて効果的であった．油対水の比が20：80の混合液にR-004を添加して超音波ホモジナイザにより処理したところ，R-004濃度が0.04，0.08，0.2％では，それぞれ，平均粒子径が1.41，1.04，0.61 umのエマルションが得られた．油の量を10，20，30，40％としたところ，濃度が低いほど平均粒径が小さいものの，40％においても平均粒径1.29 umの微細エマルションを作成することができた．

大豆油由来界面活性剤による微細エマルション作製に関する評価

許　　晴怡*[1]，中嶋　光敏*[2]，Zengshe Liu*[3]，中村　宣貴*[1]，椎名　武夫*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 筑波大学大学院
*[3] 米国農務省農業部国立農業利用研究センター

International Journal of Environmental Research and Public Health, 8, 1957-1976 (2011)

Processing conditions, rice properties, health and environment

Poritosh Roy*, Takahiro Orikasa**, Hiroshi Okadome*, Nobutaka Nakamura*, Takeo Shiina*

* National Food Research Institute, NARO
** School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University

パーボイルドライス，玄米，発芽玄米，歩搗き米，精白米のそれぞれの水飯米について，加工方法が水飯米特性および健康，環境に及ぼす影響について検討した．玄米，歩搗き米は，精白米に比べて健康に有益な成分含量が多く含まれる．搗精程度などの加工方法も水飯米のヒ素含量に影響を及ぼすものの，パーボイルドライスにおけるそれに比べて，かなり影響度が小さい．加工方法に応じて水飯米のライフサイクルCO_2は大きく異なり，喫食パターンを変えることによって，温室効果ガスの削減が可能であることが示された．

米の加工方法，水飯米特性，健康および環境負荷について

Poritosh Roy*，折笠　貴寛**，岡留　博司*，中村　宣貴*，椎名　武夫*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 宮城大学　食産業学部

Japan Agricultural Research Quarterly, 46 (1), 41-57 (2012)

A Review of life cycle assessment (LCA) of bioethanol from lignocellulosic biomass

Poritosh Roy*, Ken Tokuyasu*, Takahiro Orikasa**, Nobutaka Nakamura*, Takeo Shiina*

* National Food Research Institute, NARO
** School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University

リグノセルロースバイオマスを原料とするバイオエタノールのライフサイクルアセスメント研究を調査し，エネルギーバランス，環境負荷，コストの視点を重視することで，バイオエタノールの環境負荷低減効果と社会経済的メリットについて論じた．バイオエタノールの温室効果ガス削減効果については，ほとんどの解析事例で正の効果が示されている．一方，バイオエタノールのコストについては，使用する原料，採用するプロセス，配分方法，プラント規模などの違いで，解析事例の間で大きな違いが見られた．酵素のオンサイト生産は，環境負荷およびコストの大きな割合を占めることから，両者の削減のため，今後の研究開発が期待される．また，価値の高い副産物生産についても期待される．

リグノセルロースバイオマスを原料とするバイオエタノールのライフサイクルアセスメント

Poritosh Roy*，徳安　健*，折笠　貴寛**，中村　宣貴*，椎名　武夫*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 宮城大学食産業学部

Journal of Environmental Management, 93, 218-224 (2011)

Life cycle of meats: An opportunity to abate the greenhouse gas emission from meat industry in Japan

Poritosh Roy*, Takahiro Orikasa**, Manasikan Thammawong*, Nobutaka Nakamura*, Qingyi Xu*, Takeo Shiina*

* National Food Research Institute, NARO
** School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University

日本国内で生産される主要な３種の食肉（鶏肉，豚肉，牛肉）について，ライフサイクルCO_2を算出し，相互比較した．その結果，単位精肉質量あたりのCO_2排出量は，鶏肉，豚肉，牛肉で，それぞれ，6.0，6.9，35.6 kg CO_2-eq/kgであった．また，単位タンパク質当たりでは，鶏肉＜豚肉＜＜牛肉であったが，単位エネルギー当たりでは，豚肉＜鶏肉＜牛肉となった．現在の食肉の喫食量（全エネルギーの10％）および喫食パターン（鶏肉：36.6％，豚肉：43.9％，牛肉：19.5％）から，喫食量をWHOの推奨値である現在量の1/4程度に減らす（全エネルギーの2.2）ことで，54,00,000 t-CO_2-eq/yearの温室効果ガスの削減が可能と試算された．

食肉のLCA －日本における食肉産業からのCO2排出量削減の可能性－

Poritosh Roy*，折笠　貴寛**，Manasikan Thammawong*，中村　宣貴*，許　晴怡*，椎名　武夫*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 宮城大学食産業学部

Journal of Miyagi University, School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, 5 (1), 35-42 (2011)

Analysis of changes in moisture content and L-ascorbic acid of sweet potatoes during hot air drying

Takahiro Orikasa*[1], Takeo Shiina*[2], Akio Tagawa*[3]

*[1] School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Graduate School of Horticulture, Chiba University

30，40，50および60℃の温度条件下において，サツマイモの熱風乾燥を行い，サツマイモ乾燥試料の含水率変化およびL-アスコルビン酸変化について調査した．含水率変化は指数モデルおよび拡散方程式の無限平板モデルにより解析され，両モデルより得られた計算値と測定値は良く一致した．含水率モデルより得られた拡散係数には，アレニウス型の温度依存性が認められた．熱風乾燥過程におけるL-アスコルビン酸変化は１次反応に従うことが示され，サツマイモの熱風乾燥過程におけるL－アスコルビン酸分解の活性化エネルギーは48.8 kJ mol-1と算定された．

宮城大学紀要，5(1)，35-42（2011）

サツマイモの熱風乾燥における含水率およびL－アスコルビン酸の変動解析

折笠　貴寛*[1]，椎名　武夫*[2]，田川　彰男*[3]

*[1] 宮城大学食産業学部
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 千葉大学大学院園芸学研究科

日本食品科学工学会誌，58（7），284-290（2011）

ジャガイモのブランチングにおけるカリウム溶出およびマイクロ波の適用

安藤　泰雅*[1]，折笠　貴寛*[2]，椎名　武夫*[3]，五月　女格*[3]，五十部誠一郎*[3]，村松　良樹*[4]，田川　彰男*[1]

*[1] 千葉大学大学院園芸学研究科
*[2] 宮城大学食産業学部
*[3] 農研機構食品総合研究所
*[4] 東京農業大学生物産業学部

熱湯ブランチング過程におけるカリウム溶出現象の解析を行った結果，熱湯浸漬過程における円柱状試料のカリウム含量変化には拡散方程式の無限円筒モデルが適用され，拡散係数の値にはArrhenius型の温度依存性が確認された．また，最適なブランチング条件の把握を目的とし，ジャガイモのブランチングに熱湯浸漬，マイクロ波およびマイクロ波・熱湯併用法を適用して酵素活性，力学特性，カリウム残存率について検討した．

Leaching Losses of Potassium during Soaking in Hot Water and Application of Microwave for Blanching Potatoes

Yasumasa Ando*[1], Takahiro Orikasa*[2], Takeo Shiina*[3], Itaru Sotome*[3], Seiichiro Isobe*[3], Yoshiki Muramatsu*[4], Akio Tagawa*[1]

*[1] Graduate school of Horticulture, Chiba University
*[2] Department of Environmental Sciences School of Food, Agriculture and Environmental Sciences, Miyagi University
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] Department of Food Science and Technology, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

---

根の研究，21（1），11-16（2012）

アスパラガスの１年株における貯蔵根Brix値測定法の提案

北澤　裕明*[1]，元木　　悟*[2]，山崎　　篤*[3]，浦上　敦子*[4]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 長野県野菜花き試験場
*[3] 農研機構東北農業研究センター
*[4] 農研機構野菜茶業研究所

アスパラガスの貯蔵根Brix値は若茎の品質や収量性を左右するとされているが，その測定方法は産地により様々であり，統一化が望まれる．そこで，１年株を対象に根株における貯蔵根Brix値の分布と変動を調査するとともに，測定に用いる貯蔵根からの搾汁を容易に採取する手段として，凍結・解凍による貯蔵根の軟化処理について検討した．その結果，定植から若茎の収穫終了まで間，30 cm長の貯蔵根の鱗芽基部から10 cmの範囲におけるBrix値が根株全体の平均値をほぼ反映することが明らかとなった．また，貯蔵根をそのまま搾って測定した場合と凍結・解凍を経た後に搾って測定した場合とでは，測定値に大きな変化が生じないことも確認できた．以上の結果に基づき，１年株における貯蔵根Brix値の調査方法として，30 cm長の貯蔵根の鱗芽基部から10 cmの範囲より根サンプルを採取し，凍結・解凍を経た後に測定する手順を提案した．

A newly proposed protocol for measuring the Brix value of the storage root of 1-year-old asparagus

Hiroaki Kitazawa*[1], Satoru Motoki*[2], Atsushi Yamasaki*[3], Atsuko Uragami*[4]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station
*[3] National Institute of Tohoku Agricultural Research Center
*[4] National Institute of Vegetable and Tea Science

日本作物学会紀事，81（1），77-82（2012）

マメ類の連作圃場における活性炭の施用がダイズの生育および収量性に及ぼす影響

元木　　悟*1，西原　英治*2，北澤　裕明*3，久徳　康史*4，上原　敬義*5，矢ヶ崎和弘*1，酒井　浩晃*1，重盛　　勲*1

*1 長野県野菜花き試験場
*2 鳥取大学農学部
*3（独）農研機構食品総合研究所
*4 自治医科大学
*5 長野県農業試験場

ダイズを０，１，２，３および５年間作付けした土壌を採取し，レタスの幼苗による成長検定を行ったところ，１年以上作付けした土壌は，生育阻害活性を有することが明らかとなった．その際，活性炭添加による生育阻害の軽減効果は連作年数の増加により小さくなったことから，生育阻害活性は連作年数の増加に伴い上昇するものと考えられた．一方，供試土壌において理化学性の異常や病害の発生は認められなかったことから，ダイズにおける連作障害の一因としてアレロパシーの関与が示唆された．以上の結果を踏まえ，マメ類連作圃場への活性炭の施用がダイズの生長に及ぼす影響を，「タチナガハ」，「エンレイ」，「玉大黒」，「小真木ダダチャ」および「夏の声」の５品種を用いて調査した．その結果，「タチナガハ」，「玉大黒」および「夏の声」では，活性炭の施用により，マメ類の連作に起因する収量性の低下が軽減された．

Effect of Activated Carbon Application on the Growth and Yield of Soybean in the Field of Continuous Beans Cropping

Satoru Motoki*[1], Eiji Nishihara*[2], Hiroaki Kitazawa*[3], Yasushi Kyutoku*[4], Takayoshi Uehara*[5], Kazuhiro Yagasaki*[1]
Hiroaki Sakai*[1], Isao Shigemori*[1]

*[1] Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station
*[2] Faculty of Agriculture, Tottori University
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] Jichi Medical University
*[5] Nagano Agricultural Experiment Station

Applied and environmental microbiology, 77 (3): 1021-1032 (2011)

Modeling of pathogen survival during simulated gastric digestion

Shige Koseki, Yasuko Mizuno and Itaru Sotome

National Food Research Institute, NARO

実際の消化過程を想定した実験系で人工胃液を種々の食事パターンに対応させて分泌させ，その過程における食中毒細菌の死滅挙動を解明した．さらに得られた実験結果から，食事パターンに応じた食中毒細菌の生残予測を可能とする数理モデルを開発した．

人工消化過程における病原菌の死滅モデルの開発

小関　成樹，水野　康子，五月　女格

（独）農研機構食品総合研究所

Carbohydrate Polymers, 87 (1), 314-321 (2012).

Effect of temperature on gelatinization and retrogradation in high hydrostatic pressure treatment of potato starch–water mixtures

Kiyoshi Kawai*[1], Ken Fukami*[2] and Kazutaka Yamamoto*[3]

*[1] Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, *[2] San-ei Sucrochemical Company Limited
*[3] National Food Research Institute, NARO

馬鈴薯澱粉-水混合物（10−70%，w/w）の高静水圧処理（HHP：400−1000 MPa）における糊化及び老化に及ぼす温度（20−70℃）の影響を調べた．HHP処理澱粉の糊化エンタルピー変化（ΔHgel）及び老化結晶部分の再糊化エンタルピー変化（ΔHretro）を示差走査熱量計で評価した．10−20%試料のΔHgelは圧力及び温度の増加により減少したが，30−50%試料では温度に依存して圧力増加とともに一定値にまで低下した．高温高圧条件では，10−40%試料ではΔHgelが零に到達したが，50−70%試料ではしなかった．HHP処理した20−60%試料において老化が観測されたが，ΔHretroは澱粉含量，圧力，温度で異なった．ΔHretroの値は，澱粉含量が高い程高い傾向があった．更に，老化は，HHP処理を低温で行うと促進された．20−70℃での馬鈴薯澱粉-水混合物（10−70%）のHHP処理（400−1000 MPa）における糊化及び老化挙動は，一連の状態図としてまとめられた．

馬鈴薯澱粉-水混合物の高静水圧処理における糊化及び老化に及ぼす温度の影響

川井　清司*1，深見　　健*2，山本　和貴*3

*1 広島大学大学院生物圏科学，*2 サンエイ糖化株式会社
*3（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Cereal Science, 54 (2), 229-235 (2011).

Effects of two novel Wx-A1 alleles of common wheat (Triticum aestivum L.) on amylose and starch properties

Makoto Yamamori* and Kazutaka Yamamoto**

* National Institute of Crop Science, NARO
** National Food Research Institute, NARO

フツウコムギ（Triticum aestivum L.）は三種のWxタンパク質（Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1）を有し，これらは澱粉粒結合性澱粉合成酵素Iであり，アミロース合成に関与している．二つの新規タンパク質Wx-A1をゲル電気泳動で同定し，そのアミロース含量及び澱粉特性に及ぼす影響を解析した．対立遺伝子Wx-A1iでコードされる変異型Wx-A1タンパク質は，Wx-A1a対立遺伝子を持つ標準系統よりも少量存在し，アミロース含量は，標準系統（21.5%）と比べて7.3%と少なかった．Wx-A1i遺伝子により澱粉の特性は変化し，膨潤力，グルコアミラーゼ消化性，糊透明性，示差走査熱量分析における糊化エンタルピー変化がいずれも増加した．また，Wx-A1i系統の澱粉では，ラピッドビスコアナライザーにおける糊化特性も変化し，高いピーク粘度，低い最終粘度，低い糊化温度を示した．Wx-A1i対立遺伝子は，小麦のアミロース含量を低下させる新規な遺伝資源であり，Wx-A1j対立遺伝子でコードされる他のWx-A1タンパク質は，電気泳動ゲル上でWx-A1aよりも塩基性の等電点を示した．Wx-A1j系統は，標準系統Wx-A1aとアミロース含量の差は見られなかった．澱粉の膨潤力，糊透明性，グルコアミラーゼ消化性においても，Wx-A1j系統はWx-A1a系統と同程度のアミロースを生産していることを示唆した．

フツウコムギ（Triticum aestivum L.）の二つの新規対立遺伝子Wx-A1がアミロース及び澱粉特性に及ぼす影響

山守　誠*，山本　和貴**

*（独）農研機構作物研究所
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Food Protection, 74 (4), 176-187 (2011)

Modeling and predicting the simultaneous growth of Listeria monocytogenes and natural flora in minced tuna

Shigenobu Koseki*, Yoshiko Takizawa**, Satoko Miya**, Hajime Takahashi** and Bon Kimura**

* National Food Research Institute, NARO
** Tokyo University of Marine Science and Technology

マグロすきみ中におけるL. monocytogenesと常在菌との関係を数理モデル化した．温度2-30℃におけるL. monocytogenes数と常在菌数とを同時に相互の影響を考慮して予測することを可能とした．一定温度下のみでなく，変動する温度条件下においても高い精度での菌数変化を予測することを可能とした．

マグロすきみ中におけるリステリアと常在菌の同時予測モデル

小関　成樹*，滝沢　是子**，宮　聡子**，高橋　肇**，木村　凡*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 東京海洋大学

Journal of Food Protection, 74 (9), 1536-1542 (2011)

Comparison of two possible routes of pathogen contamination of spinach leaves in a hydroponic cultivation system

Shige Koseki, Yasuko Mizuno and Kazutaka Yamamoto

National Food Research Institute, NARO

水耕栽培ホウレンソウをモデル野菜として，食中毒細菌の汚染ルートを検討した．葉表面からの汚染と根からの吸収汚染とを定量的に比較検討した．その結果，葉表面の汚染は生育途中では主たる原因とはならず，葉表面の汚染はカット後の二次的な汚染が原因であることが示された．また，生育途中での汚染は主に根からの食中毒細菌の吸収移行が原因であることが示された．

水耕栽培ホウレンソウにおける食中毒細菌の汚染ルートの検討

小関　成樹，水野　康子，山本　和貴

（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Food Protection, 74 (9), 1543-1546 (2011)

A survey of iceberg lettuce for the presence of Salmonella, Escherichia coli O157: H7, and Listeria monocytogenes in Japan

Shige Koseki, Yasuko Mizuno, Susumu Kawasaki and Kazutaka Yamamoto

National Food Research Institute, NARO

日本国内で市販されているレタスのSalmonella, Escherichia coli O157: H7, and Listeria monocytogenesの食中毒細菌の汚染実態を２年間に渡り調査した．総計419サンプルを調査したが，いずれのサンプルからも上記の食中毒細菌は検出されなかった．

日本国内における市販レタスの病原性細菌汚染実態の調査

小関　成樹，水野　康子，川崎　　晋，山本　和貴

（独）農研機構食品総合研究所

Chemical Engineering Science, 66 (12) 5556-5565 (2011)

CFD Analysis of Microchannel Emulsification: Droplet Generation Process and Size Effect of Asymmetric Straight-Through Microchannels

Isao Kobayashi*[2], Goran T. Vladisavljevic*[1], Kunihiko Uemura*[1], Mitsutoshi Nakajima*[1, *3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Chemical Engineering Department, Loughborough University, UK
*[3] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では，CFD（数値流体力学）を利用することにより非対称貫通型マイクロチャネルを介した液滴作製プロセスの三次元シミュレーションおよび解析を行った．CFD計算データをもとに可視化した結果を解析することにより，実験では把握困難であった非対称貫通型マイクロチャネルを介した植物油滴の作製時における油水界面の挙動の詳細が明らかにされた．筆者らは，系内の流速・圧力分布データを詳細に解析し，油水界面の自発的変形にもとづく独特な液滴作製プロセスが複数の重要なステップから構成されていることを見いだした．また，チャネルサイズや液滴生産性に直結する分散相流速の影響についても定量的かつ有用な知見を得た．

マイクロチャネル乳化のCFD解析：液滴作製プロセスおよび非対称貫通孔型マイクロチャネルのサイズ効果

小林　　功*[1]，Goran T. Vladisavljevic*[2]，植村　邦彦*[1]，中嶋　光敏*[1, *3]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] 英国Loughborough大学化学工学科
*[3] 筑波大学大学院生命環境科学研究科

Food Science and Technology Research, 18 (2) 149-156 (2012)

In vitro gastrointestinal digestibility of soybean oil-in-water emulsion droplets stabilized by polyglycerol esters of fatty acid

Zheng Wang*[1, *2], Marcos A. Neves*[1, *2], Li-Jun Yin*[3], Isao Kobayashi*[2], Kunihiko Uemura*[2], Mitsutoshi Nakajima*[1, *2]

*[1] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, China

本研究では，in vitro消化モデルにおいて，乳化剤であるポリグリセリン脂肪酸エステルモノラウレート（PGE）の種類が水中大豆油滴型サブミクロンエマルションの消化特性に与える影響について検討した．分散相として大豆油を用い，連続相としてPGEを添加したリン酸緩衝液を用いた．In vitro小腸消化において，膵リパーゼのみまたは膵リパーゼと胆汁エキスを添加することにより，エマルションの粒子径およびゼータ電位の絶対値が増大した．In vitro胃腸消化モデルにおいて，エマルションの凝集や合一に対する安定性は乳化剤の種類に強く依存した．In vitro消化後におけるトータル遊離脂肪酸の放出量は乳化剤の種類に依存しなかったが．一方，分散相の割合を10 wt%から1 wt%に減少させた場合に粒子脂肪酸の転換率が36.2%から91.5%に増大することがわかった．

ポリグリセリン脂肪酸エステルにより安定化された水中大豆油滴型エマルションのin vitro胃腸消化性

王　　政*[1, *2]，Marcos A. Neves*[1, *2]，殷　　麗君*[3]，小林　　功*[2]，植村　邦彦*[2]，中嶋　光敏*[1, *2]

*[1] 筑波大学大学院生命環境科学研究科
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 中国農業大学食品科学栄養工程学院

Journal of Bioscience and Bioengineering, 112 (3) 299-303 (2011)

Emulsion Cultivation: A Miniaturized Library Screening Systems Based on Micro-droplet in Emulsion Medium

Takaaki Kojima*[1], Nobuhito Nagao*[1], Daisuke Ando*[1], Teruyo Ojima*[1], Yasuaki Kawarasaki*[2], Isao Kobayashi*[3]
Mitsutoshi Nakajima*[4], Hideo Nakano*[1]

*[1] Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University
*[2] Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka
*[3] National Food Research Institute, NARO
*[4] Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

本研究では体外分泌酵素を持つ目的微生物のみを高効率に培養することを目的とし，サンプル中に存在する全ての菌体をそれぞれ一体ずつエマルジョン内に区画化して培養・単離するエマルジョン培養法を考案した．ラクトースを炭素源とした液体培地を水層に，ミネラルオイルを油層に用いたW/Oエマルジョン内で，β-ガラクトシダーゼを分泌発現しラクトース資化能を持つ酵母L（+）株と，持たないL（−）株を１菌体ずつ培養することでL（+）を濃縮した．エマルジョン培養法により三日間培養することを1ラウンドとし，L（+）とL（−）を混合したものを菌液として３ラウンドまで培養した結果，L（+）を3.2%から87.5%まで濃縮することに成功した．

エマルション培養法：エマルション液滴内での微小化ライブラリースクリーニングシステム

兒島　孝明*[1]，長尾　伸人*[1]，安東　大介*[1]，小島　晃代*[1]，河原崎泰昌*[2]，小林　　功*[3]，中嶋　光敏*[4]，中野　秀雄*[1]

*[1] 名古屋大学大学院生命農学研究科
*[2] 静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究科
*[3] (独) 農研機構食品総合研究所
*[4] 筑波大学大学院生命環境科学研究科

食品総合研究所研究報告　76号　23-28（2012）

Arthrobacter nocotinovorans K-9の inulin fructotransferase (DFA III-producing)

原口　和朋

(独) 農研機構食品総合研究所

新たに分離したDFAIIIオリゴ糖合成酵素生産菌K-9株について分類学的検討行った結果，本菌はArthrobacter nicotinovoransと同定された．本菌株のDFAIII合成酵素を粗酵素液である培養上清からイオン交換クロマト，疎水クロマトによって電気泳動的に均一に精製した．本酵素の反応至適pHは6.0，反応至適温度は60℃であった．本酵素の耐熱性について検討するとSDS-電気泳動から40 kDa，ゲル濾過から70 kDaという価が得られた．このため本酵素はホモダイマーと推察された．

Inulin fructotransferase (DFA III-producing) from Arthrobacter nicotinovorans K-9.

Kazutomo Haraguchi

National Food Research Institute, NARO

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 39 (2) 307-315 (2012)

Characterization of Candida sp. NY7122, a novel pentose-fermenting soil yeast

Itsuki WATANABE, Akira ANDO, Toshihide NAKAMURA

National Food Research Institute, NARO

リグノセルロース系バイオマスからのエタノール生産において，六炭糖と五炭糖の両方が効率良く発酵できる酵母がコスト削減等の観点から非常に重要である．我々の分離した土壌酵母NY7122株は，六炭糖だけでなく，五炭糖（キシロースとアラビノース）を発酵することができた．種同定の結果，NY7122株はCandida subhashiiの近縁種であった．NY7122株は，これまでに報告のあるいずれの酵母株よりも高いアラビノース発酵性を示した．またNY7122株は，Scheffersomyces stipitis等の既存の五炭糖発酵性酵母が発酵できない比較的低いpH（3.5）や37℃の条件においても発酵できることが明らかとなった．

新規ペントース発酵性土壌酵母Candida sp. NY7122の特性解析

渡邉　　樹，安藤　　聡，中村　敏英

(独) 農研機構食品総合研究所

Acta Crystallographica Section F (2011) F67, 1542–1544

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dextranase from Streptococcus mutans

Nobuhiro Suzuki*[1], Young-Min Kim*[2], Zui Fujimoto*[1], Mitsuru Momma*[1], Hee-Kwon Kang*[2], Kazumi Funane*[3]
Masayuki Okuyama*[2], Haruhide Mori*[2], Atsuo Kimura*[2]

*[1] Biomolecular Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences
*[2] Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University
*[3] National Food Research Institute, NARO

グリコシド・ヒドロラーゼファミリー66に属し，5個のペプチド鎖より成るストレプトコッカス・ミュータンス由来のデキストラナーゼのN末端とC末端を短縮した変異酵素を結晶化した．分解能は1.6 Åで，空間群P21に属し，格子定数は，a＝53.2, b＝89.7，c＝63.3 Å，β＝102.3°であった．Matthews係数は4.07 Å3 Da－1であった

ストレプトコッカス・ミュータンス由来デキストラナーゼの結晶化と予備結晶解析

鈴木　喜大*[1]，キム・ヨンミン*[2]，藤本　　瑞*[1]，門間　　充*[1]，カン・ヒゴン*[2]，舟根　和美*[3]
奥山　正幸*[2]，森　　春英*[2]，木村　淳夫*[2]

*[1]（独）農業生物資源研究所
*[2] 北海道大学農学部
*[3]（独）農研機構食品総合研究所

Applied and Environmental Microbiology, 77, 6463-6469 (2011)

Phylogenetic analysis of Bacillus subtilis strains applicable to natto (fermented soybean) production

Yuji Kubo*[1], Alejandro Rooney*[2], Yoshiki Tsukakoshi*[3], Rikio Nakagawa*[1], Hiromasa Hasegawa*[1] and Keitarou Kimura*[3]

*[1] Industrial Technology Institute of Ibaraki Prefecture
*[2] Crop Bioprotection Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture
*[3] National Food Research Institute, NARO

細胞外にγ-ポリグルタミン酸を生産し且つ胞子形成能を有するBacillus属細菌を，納豆発酵能の有無によってスクリーニングした．Bacillus subtilisおよびBacillus amyloliquefaciensを含む424株から，我々は59株の納豆発酵適性株を選抜することができた．納豆発酵能とビオチン要求性は強く連鎖しており，59株すべてがビオチン要求性を示した．選抜された株をropB, purH, gyrA, groEL, polCおよび16S rRNAの遺伝子配列によるMulticolus Nucleotide Sequence Type法とAmplified Fragment Length Polymorphysm法で更に詳しく系統分析したところ，納豆発酵株はB. subtilis subsp. subtilisのなかの狭い領域にかたまって存在することが明らかとなった．

納豆発酵能を有するBacillus subtilis株の系統解析

久保　雄司*[1]，ルーニー・アレハンドロ*[2]，塚越　芳樹*[3]，中川　力男*[1]，長谷川裕正*[1]，木村啓太郎*[3]

*[1] 茨城県工業技術センター
*[2] 米国農務省・ARS穀物防御研究ユニット
*[3]（独）農研機構食品総合研究所

Applied and Environmental Microbiology, 77, 8249-8258 (2011)

Mutations Suppressing loss of DegQ function in Bacillus subtilis (natto) poly-gamma-glutamate synthesis

Thi-Huyen Do*, Yuki Suzuki**, Naoki Abe**, Jun Kaneko**, Yoshifumi Itoh*,** and Keitarou Kimura*

* National Food Research Institute, NARO
** Department of Microbial Biotechnology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

納豆菌のdegQ遺伝子は46アミノ酸からなる小さなペプチドをコードするポリ－γ－グルタミン酸（PGA）の生産に必須な遺伝子である．DegQのPGA生産における機能を理解するため納豆菌のdegQ遺伝子を破壊し，PGA生産を回復させる抑制変異を探した．抑制変異は２成分制御系DegS-DegUの受容体型リン酸化酵素であるdegS遺伝子に見つかった．DegQを大腸菌細胞内で生産，精製して試験管内リン酸化実験に供した．野生型DegSと比較したところ，変異型DegS（R208Q, M195I, L248F, D250N）はより高い自己リン酸化能を有し，D250N変異体はより低い自己脱リン酸化能を有していた．また，５つの変異体はすべてより低いDegU脱リン酸化能もしくはより低いDegU自己リン酸化能促進効果を示した．これらの性質によって変異体DegSはDegUをリン酸化された状態で安定化させ，この作用は野生型のDegS-DegUにDegQが及ぼす効果とよく似ていた．興味深いことに，DegQはDegU存在下でのみリン酸化DegSを安定化した．このことはこれら３つのタンパク質が細胞内で複合体を作っていることを示唆する．

納豆菌のポリ - γ - グルタミン酸生産に必要なDegQの欠失を抑制する変異

チ・フエン・ドウ*，鈴木　由貴**，阿部　直樹**，金子　　淳**，伊藤　義文*,**，木村啓太郎*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 東北大学大学院農学研究科

Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 1877-1884 (2012)

Extracellular production of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase
and cyclodextran by a protease-deficient Bacillus subtilis host–vector system

Yasuyuki Kawabata*, Keitarou Kimura**, Kazumi Funane**

* Faculty of Food Science and Nutrition, Osaka Shoin Women's University
** National Food Research Institute, NARO

枯草菌宿主－ベクターシステムを用いて環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ（CITase）遺伝子を発現させることによって，環状イソマルトオリゴ糖（CI；サイクロデキストラン）の生産法を開発した．バチルス・サーキュランスT-3040株由来のCITase遺伝子およびバチルス・アミロリケファシエンス由来αアミラーゼプロモーター遺伝子（PamyQ）およびamyQシグナル遺伝子を枯草菌発現ベクターpUB110に組込み，バチルス・サブチリス168株およびそのアルカリプロテアーゼ遺伝子（aprE）あるいは中性プロテアーゼ遺伝子（nprE）欠損株を宿主として発現させた．プロテアーゼ欠損株を宿主として用いると，培養48時間以内で組換えCITaseを1 U/mL生産することができた．これはサイクロデキストラン工業生産株バチルス・サーキュランスG22-10株の約7.5倍の生産量である．プロテアーゼ欠損株を宿主とし，10%デキストラン40を加えて培養すると，うち17%のデキストランがサイクロデキストランに転換した．枯草菌宿主－ベクター系を用いることにより，CITaseおよびサイクロデキストランを直接発酵生産することが可能になった．

プロテアーゼ欠損枯草菌宿主－ベクターシステムによる環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼと
サイクロデキストランの菌体外生産

川端　康之*，木村啓太郎**，舟根　和美**

* 大阪樟蔭女子大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Biochimica et Biophysica Acta, 1814, 428-434 (2011)

Deletion analysis of regions at the C-terminal part of cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase from Bacillus circulans T-3040

Kazumi Funane*[1], Yasuyuki Kawabata*[2], Ryuichiro Suzuki*[1], Young-Min Kim*[3,] *[4], Hee-Kwon Kang*[3], Nobuhiro Suzuki*[5]
Zui Fujimoto*[5], Atsuo Kimura*[3], Mikihiko Kobayashi*[6]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Faculty of Food Science and Nutrition, Osaka Shoin Women's University
*[3] Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University
*[4] KRIBB (Eco-Friendly Biomaterial Research Center, Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)
*[5] Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences
*[6] Department of Food and Health Science, Jissenn Women's University

環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ（CITase）はグリコシド・ヒドロラーゼファミリー66に属し，５つの領域｛N末端保存領域（Ser1-Gly403），介在領域R1（Tyr404-Tyr492），２つの保存領域R2（Glu493-Ser596）およびR3（Gly597-Met700），C末端領域R4（Lys701-Ser934)｝から構成される．CITaseは７個から17個のグルコースより成る環状イソマルトオリゴ糖（CI，構成するグルコースの数によりCI-7～CI-17と表す）をデキストランから合成する反応を触媒する．R1～R4領域の機能を明らかにするため，15種類の欠失変異酵素を作製した．M123Δ（R4-欠失），MΔ234（R1-欠失）およびMΔ23Δ（R1およびR4欠失）変異酵素はCIを生産したが，他の変異酵素は不活性であった．M123Δ，MΔ234およびMΔ23Δ変異酵素はデキストラン40に対するKm値が上昇した．野生型酵素とM123Δ変異酵素は主としてCI-8を生産した．MΔ234およびMΔ23Δ変異酵素はCI-8生産特性を失い，そのkcat 値は減少し，pHおよび熱安定性が低下した．以上，R2および R3領域はCITaseが活性型を取るために必須であり，R1およびR4領域は基質との結合に関与することが示唆された．

バチルス・サーキュランスT-3040株由来環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼにおける
C末端部位の欠失による機能解析

舟根　和美*[1]，川端　康之*[2]，鈴木龍一郎*[1]，キム・ヨンミン*[3,] *[4]，カン・ヒゴン*[3]，鈴木　喜大*[5]
藤本　　瑞*[5]，木村　淳夫*[3]，小林　幹彦*[6]

*[1] (独) 農研機構食品総合研究所
*[2] 大阪樟蔭女子大学
*[3] (独) 農業生物資源研究所
*[4] KRIBB（韓国）
*[5] (独) 農業生物資源研究所
*[6] 実践女子大学

Food Science and Technology Research, 17, 447-451 (2011)

Loss of γ PGA synthesis of Bacillus subtilis (natto) due to IS4Bsu1 translocation to swrA gene

Keitarou Kimura, Lam-Son Phan Tran and Kazumi Funane

National Food Research Institute, NARO

納豆菌の動く遺伝因子IS4Bsu1が自然発生的にswrA遺伝子へ転移しポリ-γ-グルタミン酸（PGA）生産能を失わせることを見出した．納豆菌株NAFIS1（swrA::IS4Bsu1）のPGA生産欠損はプラスミド上に保持されたswrA遺伝子によって相補された．IS4Bsu1のswrA遺伝子への挿入は，その下流にあるminJ遺伝子の発現には影響を及ぼしていないと考えられた．なぜならば，NAFM16株（minJ::Spc）で観察された細胞運動障害がNAFIS1株では観察されなかったからである．我々は新たにminJ遺伝子がPGA生産に必要であることを見つけた．

IS4Bsu1のswrA遺伝子への挿入によって引き起こされる納豆菌ポリ-γ-グルタミン酸合成欠損

木村啓太郎，ラムション・ファン・トラン，舟根　和美

(独) 農研機構食品総合研究所

Proteins, 80, 722-732 (2012)

Crystal structure of bacteriophage FNIT1 zinc peptidase PghP that hydrolyzes gamma-glutamyl linkage of bacterial poly-gamma-glutamate

Zui Fujimoto* and Keitarou Kimura**

* Protein Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences
** National Food Research Institute, NARO

PghP（ポリ-γ-グルタミン酸加水分解酵素）は枯草菌ファージFNIT1由来で，枯草菌が生産するポリ-γ-グルタミン酸のγ-グルタミル結合を加水分解して娘ファージの増殖を促進する．PghPの結晶構造を1.9Åの解像度で決定した．PghP構造は，それがα/β混合コアと7つの平行/逆平行βシートをもつ球状タンパク質であることを示し，亜鉛結合モチーフであるHis-Glu-HisがβシートのC末側に同定された．既知のタンパク質とアミノ酸配列相同性を持たないためにいずれのペプチダーゼファミリーにも分類されていなかったPghPは，亜鉛イオンを活性中心に持っている動物由来のカルボキシペプチダーゼAと全体構造上の相似性を有することが判明した．構造比較によってPghPの触媒作用に関与するアミノ酸残基が推定され，そのことはアミノ酸置換変異体の導入によって確認された．

γ-ポリグルタミン酸を加水分解するバクテリオファージFNIT1由来の亜鉛ペプチダーゼPghPの結晶構造

藤本　　瑞*，木村啓太郎**

*（独）農業生物資源研究所
**（独）農研機構食品総合研究所

Applied Microbiology and Biotechnology, 93, 655-669 (2012)

Enzymatic properties of the glycine D-alanine aminopeptidase of Aspergillus oryzae and its activity profiles
in liquid-cultured mycelia and solid-state rice culture (rice-koji).

Junichiro Marui*[1], Mayumi Matsushita-Morita*[1], Sawaki Tada*[1], Ryota Hattori*[1], Satoshi Suzuki*[1], Hitoshi Amano*[2]
Hiroki Ishida*[3], Youhei Yamagata*[4], Michio Takeuchi*[4], Ken-Ichi Kusumoto*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Amano Enzyme Inc.
*[3] Gekkeikan Sake Co., Ltd.
*[4] Department of Applied Molecular Biology and Biochemistry, Tokyo University of Agiculture and Technology

S12ファミリーに属するグリシン-D-アラニンアミノペプチダーゼ（GdaA）をコードするgdaA遺伝子が，産業用糸状菌であるAspergillus oryzaeにおいて見出された．同酵素はグラム陰性菌Ochrobactrum anthropiのD-アミノペプチダーゼとアミノ酸配列で43%の同一性を示した．A. oryzaeを宿主として過剰発現させ精製した同酵素は，高いD-立体特異性を示し，N末端のグリシンあるいはD-アラニンを基質から極めて特異的に遊離した．また，同酵素の酵素化学的性質を解明した．GdaAは液体培養における静止期で，細胞内のグリシン及びD-アラニンアミノペプチダーゼ活性の大半を担っていた．A. oryzaeのアミノペプチダーゼは，様々なアミノ酸やペプチドを酵素的に遊離し，発酵食品の旨味促進の点から重要である点で，注目されている．GdaA活性は，日本の伝統的発酵食品の種菌として広く用いられているA. oryzaeの米固体培養物（米麹）の抽出液から検出された．

丸井淳一朗*[1]，松下（森田）真由美*[1]，多田　功生*[1]，服部　領太*[1]，鈴木　　聡*[1]，天野　　仁*[2]
石田　博樹*[3]，山形　洋平*[4]，竹内　道雄*[4]，楠本　憲一*[1]

*[1]（独）農研機構　食品総合研究所
*[2] 天野エンザイム株式会社
*[3] 月桂冠株式会社
*[4] 東京農工大学大学院共生科学技術研究院

Bioscience, Biotechnology, Biochemistry, 75 (4), 662-668 (2011)

Enzymatic properties of the recombinant serine-type carboxypeptidase OcpC, which is unique to Aspergillus oryzae

Hiroto Morita*[1], Haruka Abo*[1], Ayako Okamoto*[1], Hiroshi Maeda*[1], Youhei Yamagata*[1], Ken-Ichi Kusumoto*[2]
Hitoshi Amano*[3], Hiroki Ishida*[4] and Michio Takeuchi*[1]

*[1] Department of Applied Molecular Biology and Biochemistry, Tokyo University of Agiculture and Technology
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Amano Enzyme Inc.
*[4] Gekkeikan Sake Co., Ltd.

Aspergillus oryzae RIB40の遺伝子AO090103000153は，セリン型カルボキシペプチダーゼをコードすると推測される．本研究では，同遺伝子産物を異種生産させ，精製，特性解明した．同精製酵素は実際にセリン型カルボキシペプチダーゼ活性を示した．このプロテアーゼは45℃以下，低pH領域で安定であり，Nアセチル化ペプチドに対する広い基質特異性を示した．一方，既報のA. oryzae由来カルボキシペプチダーゼよりも，極めて低い基質特異性と，基質に対する低いkcat値を示した．

Aspergillus oryzaeに特有なセリンタイプカルボキシペプチダーゼOcpCの組換え酵素の特性

森田　寛人*[1]，阿保　春花*[1]，岡本　綾子*[1]，前田　　浩*[1]，山形　洋平*[1]，楠本　憲一*[2]，天野　　仁*[3]
石田　博樹*[4]，竹内　道雄*[1]

*[1] 東京農工大学大学院共生科学技術研究院
*[2]（独）農研機構　食品総合研究所
*[3] 天野エンザイム株式会社
*[4] 月桂冠株式会社

Food Science and Technology Research, 18 (1), 83-90 (2012)

Comparison of acid phosphatase gene expression profiles in solid-state rce and soybean cultures of an Aspergillus oryzae strain with low acid phosphatase activity (KBN8048): implications for miso brewing

Junichiro Marui*[1], Sawaki Tada*[1], Mari Fukuoka*[1], Satoshi Suzuki*[1], Ryota Hattori*[1], Yutaka Wagu*[2], Yohei Shiraishi*[2]
Noriyuki Kitamoto*[3], Tatsuya Sugimoto*[4] and Ken-Ichi Kusumoto*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Bio'c
*[3] Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute
*[4] Nakamo

Aspergillus oryzae KBN8048は，味噌醸造における米麹及び豆麹において低レベルの酸性ホスファターゼ活性を示す菌株として選択された．後者ではその酵素活性は特に低く，味噌の呈味性を増強するIMPの脱リン酸化活性の低下と相関していた．転写解析に基づき，13種類の同株由来酸性ホスファターゼ遺伝子群を，米麹で高発現するR型と豆麹で高発現するS型に分類した．R型遺伝子群は，酸性pH域及び低リン酸下に応答してその発現が上昇し，それぞれの応答はpH依存性転写因子PacC，出芽酵母のPho4pに相同なリン酸欠乏下転写促進因子を介すると考えられた．一方，S型遺伝子群の転写様式から考察すると，豆麹においてはpHやリン酸獲得性以外の誘導的制御要因に応答した未解明な遺伝子制御機構が存在することが示唆された．

Aspergillus oryzae低ホスファターゼ株（KBN8048）の米麹及び豆麹における酸性ホスファターゼ遺伝子発現様式の比較

丸井淳一朗*[1]，多田　功生*[1]，福岡　真里*[1]，鈴木　　聡*[1]，服部　領太*[1]，和久　　豊*[2]，白石　洋平*[2]
北本　則行*[3]，杉本　達哉*[4]，楠本　憲一*[1]

*[1]（独）農研機構　食品総合研究所
*[2] 株式会社ビオック
*[3] 愛知県産業技術研究所　食品工業技術センター
*[4] ナカモ株式会社

Food Science and Technology Ressearch, 18 (1), 59-65 (2012)

Disruption and overexpression of acid phosphatase gene (aphA) from a miso koji mold, Aspergillus oryzae KBN630, and characterization of the gene product

Shoko Yoshino-Yasuda*[1], Osamu Hasegawa*[1], Yoshimi Iga*[2], Yohei Shiraishi*[2], Yutaka Wagu*[2], Tohru Suzuki*[3]
Tatsuya Sugimoto*[4], Ken-Ichi Kusumoto*[5], Masashi Kato*[6] and Noriyuki Kitamoto*[1]

*[1] Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute
*[2] Bio'c
*[3] The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University
*[4] Nakamo
*[5] National Food Research Institute, NARO
*[6] Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University

味噌用麹菌株であるA. oryzae KBN630の酸性ホスファターゼA遺伝子（aphA）を，近年開発された相同遺伝子置換技術を用いて破壊した．同遺伝子破壊は，蒸煮大豆上の生育に影響が見られなかった．同破壊株における酸性ホスファターゼ生産量は，野生型株の約80%となった．A. oryzae TEF1遺伝子のプロモータを利用し，AphA酵素をA. oryzaeで高生産した結果，培地中に分泌することに成功した．AphA酵素は，58.0から65.0 kDaの分子量を有し，反応の最適pHは4.0，同最適温度は40℃であった．AhpA酵素は核酸系調味料として用いられるGMPやIMPから無機リン酸を遊離する活性を示した．

味噌用麹菌株KBN630の酸性ホスファターゼ遺伝子（aphA）の破壊，高発現及び，遺伝子産物の特性解明

安田　庄子*[1]，長谷川　摂*[1]，伊賀　佳美*[2]，白石　洋平*[2]，和久　　豊*[2]，鈴木　　徹*[3]
杉本　達哉*[4]，楠本　憲一*[5]，加藤　雅士*[6]，北本　則行*[1]

*[1] 愛知県産業技術研究所　食品工業技術センター
*[2] 株式会社ビオック
*[3] 岐阜大学大学院農学研究科
*[4] ナカモ株式会社
*[5]（独）農研機構　食品総合研究所
*[6] 名城大学農学部

Journal of Applied Glycoscience, 58, 31-34 (2010)

Enzymatic production of Glucosylxylose using a cellobiose phosphorylase-yeast combined system

Akio Kumagai*, Sawaki Tada**, Kouichi Nozaki*, Masahiro Mizuno*, Takahisa Kanda*, Satoshi Suzuki**
Kenichi Kusumoto**, Takashi Sasaki*, Yutaka Kashiwagi** and Yoshihiko Amano*

* Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering, Shinshu University
** National Food Research Institute, NARO

セロビオースホスホリラーゼ（CBP）を用いて希少なβ型二糖類を合成するため，Cellvibrio gilvusの同酵素遺伝子をAspergillus oryzaeを宿主として，細胞内で発現させた．組換え型CBPを宿主菌糸内に維持させたまま冷アセトン処理を行い，菌糸乾燥粉末を調製した．次に，反応液からグルコースを除去することにより4-O-β-D-glucopyranosyl-D-xylopyranose（GX）の合成を促進させるため，乾燥酵母を反応液に添加した．この酵素含有粉末−酵母複合系は，酵母を添加しない場合よりも，セロビオースからのGX合成効率が3.5倍高くなった．

セロビオースホスファターゼ−酵母複合系によるグルコシルキシロースの酵素的生産

熊谷　明夫*，多田　功生**，野崎　功一*，水野　正浩*，神田　孝久*，鈴木　　聡**
楠本　憲一**，佐々木　堯*，柏木　　豊**，天野　良彦*

* 信州大学工学部
**（独）農研機構　食品総合研究所

食品総合研究所研究報告，76，33-38（2012）

醤油粕の植物細胞壁分解酵素製剤及び糸状菌培養による減量効果

服部　領太*，楠本　憲一*，鈴木　　聡*，北本　則行**，柏木　　豊*

*（独）農研機構　食品総合研究所
** 愛知県産業技術研究所　食品工業技術センター

醤油加工副産物である醤油粕の低減化と微生物培養基への利用を目的とした．市販植物細胞壁分解酵素製剤により，供試した醤油粕の不溶性固形分は，最高で対照区の約70％に減少した．また，醤油粕培地上における糸状菌14株の静置培養を行ったところ，A. tamarii NFRI1618は生育菌体量が高く，不溶性固形分の減量も対照区の69%と，酵素製剤使用時の固形分減量率に匹敵した．そのため，A. tamarii NFRI1618は醤油粕培地で生育量の高い菌株として，醤油粕の飼料としての栄養的価値を上昇させる可能性が考えられる．

The decreasing effect of soy sauce refuge by degradation with plant cell wall hydrolyzing enzymes and culture of filamentous fungi

Ryota Hattori*, Ken-Ichi Kusumoto*, Satoshi Suzuki*, Noriyuki Kitamoto** and Yutaka Kashiwagi*

* National Food Research Institute, NARO
** Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute

---

Acta Horticulturae 907, 367-370 (2011)

Microarray analysis of blue or yellow weak light effect to genes in arabidopsis

Rimi OKUSHIMA*[1], Sadanori SASE*[1], Yumiko IWAHASHI*[1], Yoshinori MURATA*[2], Naoya FUKUDA*[3]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Japan International Reserach Center for Agricultural Sciences
*[3] University of Tsukuba

Arabitopsisを弱ブルー又はイエローライト下で栽培し，その影響をDNAマイクロアレイを用いて調べた．42%の遺伝子はイエローライト下でその発現が誘導され，38%の遺伝子がブルーライト下で発現が誘導された．その中で，２倍以上発現が誘導された遺伝子は，イエローライト下では498個，ブルーライト下では652個であった．

弱ブルーまたはイエローライト下で発現しているアラビドプシスの遺伝子のマイクロアレイを用いた解析

奥島　里美*[1]，佐瀬　勘紀*[1]，岩橋由美子*[1]，村田　善則*[2]，福田　直也*[3]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2]（独）国際農林水産業研究センター
*[3] 筑波大学

Applied and Environmental Microbiology 77, 437-4382 (2011)

Involvement of the azorhizobial chromosome partition gene (parA) in the onset of bacteroid differentiation during Sesbania rostrata stem nodule development

Chi-Te Liu*[1], Kyung-Bum Lee*[2], Yu-Sheng Wang*[3], Min-Hua Peng*[3], Kung-Ta Lee*[3], Shino Suzuki*[4]
Tadahiro Suzuki*[5], Hiroshi Oyaizu*[6]

*[1] Institute of Biotechnology, National Taiwan University (Taiwan)
*[2] Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan (DDBJ), National Institute of Genetics
*[3] Department of Biochemical Science and Technology, National Taiwan University (Taiwan)
*[4] J. Craig Venter Institute (USA)
*[5] National Food Research Institute, NARO
*[6] Biotechnology Research Center, The University of Tokyo

根粒菌Azorhizobium caulinodans ORS571のparA遺伝子欠損株（ΔparA）を用いて根粒菌と植物の共生機構に対するparAの機能を調べた．宿主植物であるSesbania rostrataの茎にΔparAを接種すると，３種の未成熟な茎粒が形成され，窒素固定能も不十分であった．茎粒内のバクテロイドは複数の成長段階にある事が示されたため，バクテロイド形成のインディケーターと考えられているbacA遺伝子の変異株（ΔbacA）との比較を行った．比較-相補試験の結果，bacAの遺伝子発現はparAの発現に依存している事が示唆された．parAの発現と茎粒の成熟には負の相関があり，茎粒の成熟と共に転写が停止した．これらの結果は，parAが植物共生時の根粒菌バクテロイド化において負の制御を担っている事を明らかにした．

セスバニアロストラータの茎粒形成時におけるバクテロイド分化に関して根粒菌のparA遺伝子が果たす役割

Chi-Te Liu*[1]，Kyung-Bum Lee*[2]，Yu-Sheng Wang*[3]，Min-Hua Peng*[3]，Kung-Ta Lee*[3]，鈴木　志野*[4]
鈴木　忠宏*[5]，小柳津広志*[6]

*[1] Institute of Biotechnology, National Taiwan University (Taiwan)
*[2] 国立遺伝学研究所
*[3] Department of Biochemical Science and Technology, National Taiwan University (Taiwan)
*[4] J. Craig Venter Institute (USA)
*[5]（独）農研機構食品総合研究所
*[6] 東京大学生物生産工学研究センター

Chem-Bio Inform J. 11, 41-51 (2011)

Gene expression profile of MAP kinase PTC1 mutant exposed to deoxynivalenol

Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi

National Food Research Institute, NARO

かび毒生産病害に対する食品の安全性確保技術の開発のため，酵母細胞の豊富な遺伝子情報を活用し，デオキシニバレノール（DON）の引き起こすDNAダメージの情報を遺伝子発現変化として抽出し，同様の条件において過去に実施したアフラトキシンB1（AFB1）の結果と比較した．酵母のPTC1遺伝子変異株に対するDONの曝露試験結果から，一般的なDONの毒性と同時にAFB1とは異なる核酸合成遺伝子の異常が認められた．また，スフィンゴ脂質代謝経路の遺伝子発現が抑制され，細胞周期の調節シグナルに異常が生じていると考えられた．葉酸合成系の遺伝子発現が抑制されていたことから葉酸の添加試験を行い，DONの毒性作用を低減できる可能性が示唆された．

酵母PTC1遺伝子変異株に対するデオキシニバレノールの暴露と遺伝子発現変化

鈴木　忠宏，岩橋由美子

（独）農研機構食品総合研究所

J Agric Food Chem. 59, 7145-7154, (2011).

Gene expression profiles of yeast Saccharomyces cerevisiae sod1 caused by PAT toxicity, and evaluation of recovery potential of ascorbic acid

Tadahiro Suzuki, Yumiko Iwahashi

National Food Research Institute, NARO

国内において規制対象のマイコトキシンであるパツリンの細胞毒性と，アスコルビン酸（AsA）の効果に関して網羅的な情報を得るために，酵母の酸化還元酵素をコードするSOD1の遺伝子変異株（sod1）を用いた毒性評価試験を実施した．曝露試験の結果，sod1には生育の遅延・阻害が生じ，sod1のパツリンに対する強い感受性が確認された．そこで抗酸化機能を持つAsAを添加したところ，生育阻害は解消された．DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析においてもAsAを添加することで遺伝子発現の変化を抑える事が確認された．しかし，遺伝子発現のレベルでは完全な回復は確認されなかった．また，細胞周期の遺伝子群を抽出・比較したところ，AsAの添加はG2/M期よりもG1/S期に関与する遺伝子の回復に効果的であった．これらの結果はAsAがパツリンの毒性に対して一定の毒性緩和能力を有しているものの，完全な回復剤とはならない事を示唆した．

パツリンの毒性によって引き起こされる酵母SOD1遺伝子変異株の遺伝子発現変化とアスコルビン酸による回復効果の評価

鈴木　忠宏，岩橋由美子

（独）農研機構食品総合研究所

Applied Microbiology and Biotechnology, 93 (4), 1513-1522 (2012)

Discovery of nigerose phosphorylase from Clostridium phytofermentans

Takanori Nihira*, **, Hiroyuki Nakai*, **, Kazuhiro Chiku* and Motomitsu Kitaoka*

* National Food Research Institute, NARO
** Faculty of Agriculture, Niigata University

糖加水分解酵素ファミリー（GH）65に属するClostridium phytofermentans由来新規ホスホリラーゼ（Cphy1874）の特異性を解析した．大腸菌で調製した組換えCphy1874タンパクはリン酸存在下でニゲロースをグルコースとβ-グルコース1-リン酸に反転型加リン酸分解した．ニゲロース加リン酸分解の速度パラメータはkcat=67 s－1, Km=1.7 mMであった．本酵素は他のGH65酵素の基質であるトレハロース，マルトース，トレハロース6-リン酸には作用せず，コージビオースには微弱な加リン酸分解活性を示した．逆反応においてグルコースが最も良いアクセプターとなり反応初期には生成物の大部分はニゲロースであった．グルコース以外では活性順にキシロース，1,5-アンヒドログルシトール，ガラクトース，メチルα-グルコシドがアクセプターとして作用した．すべての基質で1,3結合が主生成物であったが，キシロースおよびメチルα-グルコシドを用いた場合には著量の1,2結合も生成した. 本酵素の正式名として3-α-D-glucosyl-D-glucose:phosphate β-D-glucosyltransferase，慣用名としてニゲロースホスホリラーゼを提案する．

Clostridium phytofermentans由来ニゲロースホスホリラーゼの発見

仁平　高則*, **，中井　博之*, **，知久　和寛*，北岡　本光*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 新潟大学農学部

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 76 (2), 343-348 (2012)

Characterization of a bacterial laminaribiose phosphorylase

Motomitsu Kitaoka, Yasuyuki Matsuoka, Kiyotaka Mori, Mamoru Nishimoto, Kiyoshi Hayashi

National Food Research Institute, NARO

細菌性ラミナリビオースホスホリラーゼ（LBPbac）はPaenibacillus sp YM-1株の無細胞抽出液より初めて単離同定された．本酵素はラミナリビオースを加リン酸分解し，グルコース1リン酸とグルコースを生成するが他のグルコ二糖には作用しない．また，わずかだが，ラミナリトリオースやそれ以上の重合度のラミナリオリゴ糖にも作用する．基質の重合度特異性はユーグレナ由来のラミナリビオースホスホリラーゼ（LBPEug）と明確に異なっていた．LBPbacはLBPEugよりもラミナリビオースに特異性が高いといえる．LBPbacのアクセプター特異性ははLBPEugと同様であった．LBPbacの遺伝子をクローニングしたところ，LBPbacはセロビオースホスホリラーゼやセロデキストリンホスホリラーゼ，ジアセチルキトビオースホスホリラーゼが属するGH94のメンバーであることがわかった．その遺伝子の上流には細胞外で生じたラミナリビオースを利用するためのラミナリオリゴ糖に特異的なABCトランスポーターコンポーネントをコードする遺伝子が存在していた．この役割は細胞内貯蔵型β1，3グルカン，パラミロンの利用に関与するLBPEugと箱となるものである．

細菌性ラミナリビオースホスホリラーゼの特性解析

北岡　本光，松岡　靖幸，森　　清貴，西本　　完，林　　清

（独）農研機構食品総合研究所

Carbohydrate Research, 346 (15), 2432-2436 (2011)

One-pot enzymatic production of 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (GalNAc) from 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (GlcNAc)

Kousuke Inoue, Mamoru Nishimoto, Motomitsu Kitaoka

National Food Research Institute, NARO

N-アセチルガラクトサミンは生物学的機能を持った糖鎖を構成する単糖である．しかしながら，自然界にはそれを多く含んだ資源が存在しないことからその利用が制限されている．N-アセチルガラクトサミンを生成するため，豊富に存在しているN-アセチルグルコサミンからビフィズス菌のガラクト-N-ビオース/ラクト-N-ビオースI経路に関与する３つの酵素を用いてワンポットでN-アセチルガラクトサミンに変換した．最適条件の下，600 mMのN-アセチルグルコサミンから触媒量のATPおよびUDP-Glcを加えることで反応平衡である170 mMのN-アセチルガラクトサミンが生成した．生成したN-アセチルガラクトサミンは工業用分離に良く用いられるカチオン交換担体によるクロマトグラフィーによってN-アセチルグルコサミンから分離することができた．

N-アセチルグルコサミンからのN-アセチルガラクトサミンへのワンポット酵素変換

井上　公輔，西本　　完，北岡　本光

（独）農研機構食品総合研究所

Carbohydrate Research, 350, 94-97 (2012)

3-O-α-D-Glucopyranosyl-L-rhamnose phosphorylase from Clostridium phytofermentans

Takanori Nihira*, **, Hiroyuki Nakai*, ** and Motomitsu Kitaoka*

* National Food Research Institute, NARO
** Faculty of Agriculture, Niigata University

我々はClostridium phytofermentans.の糖加水分解酵素ファミリー65（GH65）に属するタンパクの一つ（Cphy1019）が報告例の無いホスホリラーゼ活性を示すことを見つけた．大腸菌に生産させた組換えCphy1019は他のGH65の基質であるトレハロース，コージビオース，ニゲロース，マルトースに作用しなかった．逆反応ではβ-D-グルコース1-リン酸をドナーとしたときL-ラムノースのみアクセプターとして作用し，3-O-α-D-グルコピラノシル-L-ラムノースを生成した．本酵素の正式名として3-O-α-D-glucopyranosyl-L-rhamnose: phosphate β-D-glucosyltransferase，慣用名として3-O-α-D-グルコピラノシル-L-ラムノースホスホリラーゼを提案した．

Clostridium phytofermentans由来3-O-α-D-グルコピラノシル-L-ラムノースホスホリラーゼ

仁平　高則*,**，中井　博之*,**，北岡　本光*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 新潟大学農学部

Glycobiology, 22 (3), 361-368 (2012)

Bifidobacterium longum subsp. infantis uses two different β-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides

Erina Yoshida*[1], Haruko Sakurama*[1], Masashi Kiyohara*[1], Masahiro Nakajima*[2], Motomitsu Kitaoka*[2], Hisashi Ashida*[3], Junko Hirose*[4]
Takane Katayama*[1], Kenji Yamamoto*[1] and Hidehiko Kumagai*[1]

*[1] Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Graduate School of Biostudies, Kyoto University
*[4] Department of Life Style Studies, University of Shiga Prefecture

母乳栄養乳児腸管には特定種のビフィズス菌が定着し，ヒトミルクオリゴ糖（HMOs）がビフィズス菌増殖因子と考えられている．最近の研究からBifidobacterium longum subsp. infantisはHMOsを唯一の炭素源として増殖できることは示されている．このHMOs代謝能は遺伝子クラスター（HMOクラスター1）によるものと考えられている．しかしながら本菌株のHMOs代謝経路に関わる酵素活性は未解明である．我々は本亜種のβ-ガラクトシダーゼの特性解析を行い，HMOsのタイプⅠおよびタイプⅡ分解に関わる酵素を特定した．HMOsクラスター1と離れた位置に存在するBlon_2016遺伝子のコードする酵素（Bga42A）はLNTに特異性の高い新規なガラクトシダーゼであり，LNT β-1,3-ガラクトシダーゼと命名した．HMOクラスター1中にあるBlon_2334遺伝子はラクトースとタイプⅡ分解に関わるβ-ガラクトシダーゼ（Bga2A）をコードしていた．リアルタイムPCR解析により，両酵素遺伝子ともにHMOs代謝時に発現していることが示された．この結果は，この亜種はHMOsのタイプⅠおよびタイプⅡ代謝に異なるβ-ガラクトシダーゼを用いていることを示している．タイプⅠ分解β-ガラクトシダーゼ が天然では希少なこと，およびBga42Aホモログが乳児型ビフィズス菌に広く分布しておりこれらの菌種はLNTを資化できることは，ビフィズス菌とヒトの共進化を示唆している．

Bifidobacterium longum subsp. infantis usesはヒトミルクオリゴ糖タイプⅠ，Ⅱ鎖の分解に二種の異なるβ-ガラクトシダーゼを用いる

吉田永史奈*[1]，櫻間　晴子*[1]，清原　正志*[1]，中島　将博*[2]，北岡　本光*[2]，芦田　　久*[3]，広瀬　潤子*[4]
片山　高嶺*[1]，山本　憲二*[1]，熊谷　英彦*[1]

*[1] 石川県立大学・生物資源科学研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 京都大学大学院生命科学研究科
*[4] 滋賀県立大学人間文化学部

Journal of Applied Glycoscience, 58 (3), 107-114 (2011)

Mutational analysis of fungal family 11 xylanases on the pH optimum determination

Shinya FUSHINOBU*, Takeo UNO*, Motomitsu KITAOKA**, Kiyoshi HAYASHI**, Hiroshi MATSUZAWA* and Takayoshi WAKAGI*

* Department of Biotechnology, The University of Tokyo
** National Food Research Institute, NARO

糖加水分解酵素ファミリー（GH）11に属するキシラナーゼは種々の至適pHを示す．酸/塩基触媒残基近傍に存在する一つの残基が至適pHを決定している．酸性キシラナーゼではこの残基はAspであり，中性及びアルカリ性キシラナーゼではAsnである．Aspergillus kawachiiは２種のGH11キシラナーゼを産生し，この残基は酸性キシラナーゼのXynCではAsp37，中性キシラナーゼのXynBではAsn43である．至適pH決定メカニズムを調べるために，Asp/Asnを含む種々の変異酵素を作成した．pH活性相関は天然基質であるキシランまたは合成基質であるo-ニトロフェニルキシロビオシドを用いて測定した．XynC-D37N変異は至適pHを2.8から5.5まで上昇させ，XynB-N43D変異は，4.2から3.6まで低下させた．XynC-D37Nの構造から，変異により酸塩基触媒残基との水素結合が弱まることが示唆された．変異体酵素の速度解析の結果から，ES 複合体のイオン化がXynCの好酸性を決定している要因であることが示唆された．そこで活性クレフトに存在する他の残基の変異を調べたところ，Glu118およびTyr10もXynCの好酸性に関与していることがわかった．XynC-F131W変異は合成基質に対する活性を8.4倍高めた．血漿康応解析の結果から，基質結合クレフト内の芳香族側鎖のパッキングが活性に影響していることが示唆された．

カビ由来ファミリー11キシラナーゼのpH特異性決定機構の解析

伏信　進矢*，宇野　武生*，北岡　本光**，林　　清**，松沢　　洋*，若木　高善*

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Applied Glycoscience, 58 (3), 115–118 (2011)

p-Nitrophenyl β-glycosides of β-1,4-gluco/xylo-disaccharides for the characterization of subsites in endo-xylanases

Mamoru Nishimoto, Atsushi Kobayashi, Yuji Honda, Motomitsu Kitaoka, Kiyoshi Hayashi

National Food Research Institute, NARO

グリコシドヒドロラーゼファミリー10に属するエンドキシラナーゼの－側のサブサイトにおける基質認識を調査するため，４種のβ1, 4グルコ/キシロ二糖のpNP配糖体を基質としたときの４種のエンドキシラナーゼにおける速度論パラメーターを求めた．４種のエンドキシラナーゼはそれぞれBacillus halodurans C-125株，Thermotoga maritima MSB8，Clostridium stercorarium F9，Cellulomonas fimi 由来の酵素を使用した．全てのキシラナーゼは４種全ての基質を加水分解した．全ての酵素において４種の基質に対するKm値を低い順に並べると全て同様の並びになった．このことはサブサイト－1，－2において全ての酵素がグルコースよりもキシロースを好むことを示している．基質による速度論パラメーターの比較はサブサイト－1および－2における基質の認識性に対する詳細な情報を与えた．

β1, 4グルコ/キシロ二糖のpNP配糖体によるエンドキシラナーゼのサブサイト特性解析

西本　完，小林　厚志，本多　裕司，北岡　本光，林　清

（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Applied Glycoscience, 58 (3), 125–127 (2011)

An enzymatic colorimetric quantification of orthophosphate

Bingxue Li*, **, Takanori Nihira*, Hiroyuki Nakai*, Mamoru Nishioto*, Motomitsu Kitaoka*

* National Food Research Institute, NARO
** Shenyang agricultural University

リン酸エステル存在下におけるオルトリン酸の定量には生化学的なアッセイが必要とされる．我々はピルビン酸オキシダーゼとペルオキシダーゼを用いた酵素的なオルトリン酸の比色定量法を開発した．定量のための標準曲線はリン酸エステル存在に全く影響を受けなかった．さらにこの方法の利点はリン酸を遊離する酵素の反応を経時的にモニターすることを可能にした．

オルトリン酸の酵素を用いた比色定量法

Bingxue Li*, **，仁平　高則*，中井　博之*，西本　完*，北岡　本光*

*（独）農研機構食品総合研究所
** Shenyang agricultural University

Journal of Applied Glycoscience, 58 (3), 91-97 (2011)

Interactions between glycoside hydrolase family 94 cellobiose phosphorylase and glucosidase inhibitors

Shinya FUSHINOBU*, Masafumi HIDAKA*, Andressa M. HAYASHI*, Takayoshi WAKAGI*
Hirofumi SHOUN* and Motomitsu KITAOKA**

* Department of Biotechnology, The University of Tokyo
** National Food Research Institute, NARO

アザ糖は糖加水分解酵素の強力な阻害剤として知られている．今回，Cellvibrio gilvus由来セロビオースホスホリラーゼ（CBP）に対する四種のアザ糖（イソファゴミン，1-デオキシノジリマイシン，カタノスペリミン，カリステジンB2）およびアザ糖以外のグルコノラクトンの阻害効果を調べた．イソファゴミンはCBPを強力に阻害したが，1-デオキシノジリマイシン，カタノスペリミンおよびグルコノラクトンは中程度-微弱な阻害しか示さなかった．カリステジンB2はCBPを阻害しなかった．硫酸はリン酸に対する非常に弱い拮抗阻害剤として作用した．CBPのイソファゴミンおよび1-デオキシノジリマイシンとの共結晶の構造解析により加リン酸分解酵素の阻害剤への認識機構について明らかにした．阻害剤はサブサイト-1に結合し，アミノ酸残基及びアニオン（リン酸または硫酸）と数個の水素結合を形成していた．イソファゴミンの強力な阻害は環内アミノ基とリン酸との静電相互作用によるものと推定した．

糖加水分解酵素ファミリー94セロビオースホスホリラーゼと糖加水分解酵素阻害剤の相互作用

伏信　進矢*，日高　將文*，林アンドレッサ*，若木　高善*，祥雲　弘文*，北岡　本光**

* 東京大学大学院農学生命科学研究科
**（独）農研機構食品総合研究所

Journal of Applied Glycoscience, 58 (4), 129-132 (2011)

Self-transferring product inhibition observed during the hydrolysis of aryl- β -glucopyranosides by a β -glucosidase from Agrobacterium tumefaciens

Motomitsu Kitaoka*, Tomoya Takahashi*, Li Ying*, ** and Kiyoshi Hayashi*

* National Food Research Institute, NARO
** China Agricultural University

酵素反応は一般的に反応初期には一定速度で進行する．我々は，Agrobacterium tumefaciens由来β－グルコシダーゼ（Cbg1）の1 mM pNP-Glc加水分解の経時変化がKmよりも十分高い基質濃度にも関わらず分解率５％以内の範囲で直線性を示さないことを観測した．より高濃度のpNP-Glc分解でもほぼ同じ挙動を示したことから，直線性を示さない原因は生成物pNP濃度によると考えた．種々のアルコールを反応系に添加すると直線性を回復した．生成物であるpNPが糖転移アクセプターとして作用する自己転移生成物阻害機構を提案した．理論線は実測値と良く一致した．

Agrobacterium tumefaciens由来β-グルコシダーゼのアリール－β－グルコシド分解で観測される自己転移生成物阻害

北岡　本光*，高橋　智也*，Li Ying*, **，林　　清*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 中国農業大学

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74 (1-2), 97-102 (2012)

Identification of amino acid residues determining substrate preference of 1,3- β -galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase

Mamoru Nishimoto*, Masafumi Hidaka**, Masahiro Nakajima*, Shinya Fushinobu**, Motomitsu Kitaoka*

* National Food Research Institute, NARO
** The University of Tokyo

β1, 3ガラクトシルＮアセチルヘキソサミンホスホリラーゼの３つのアミノ酸残基がガラクト－N－ビオース（GNB）とラクト－N－ビオースI（LNB）の基質の好みを決定する因子であることがタンパク質の立体構造から示唆された．そこでGNBとLNBに同様に働くビフィズス菌由来のβ1, 3ガラクトシルＮアセチルヘキソサミンホスホリラーゼを用いてミュータントを作製し，それらの基質特異性について調べた．その結果，V162T変異酵素はGNBに対する選択性が増加した．一方，P161S, S336A両変異酵素はそれぞれ独立してLNBに対する選択性が増加していた．アミノ酸配列のアラインメントでは相同性の高い多くのアミノ酸配列の基質選択性がどのようになっているかをこの3つのアミノ酸残基を比較することで予測可能であることが示唆された．

β1, 3ガラクトシルＮアセチルヘキソサミンホスホリラーゼの基質特異性に関与するアミノ酸残基の同定

西本　　完*，日高　將文**，中島　将博*，伏信　進矢**，北岡　本光*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 東京大学

The Journal of Biological Chemistry, 286 (40), 34583-34592 (2011)

Physiology of the consumption of human milk oligosaccharides by infant-gut associated bifidobacteria

Sadaki Asakuma*[1], Emi Hatakeyama*[2], Tadasu Urashima*[2], Erina Yoshida*[3], Takane Katayama*[3], Kenji Yamamoto*[3]
Hidehiko Kumagai*[3], Hisashi Ashida*[4], Junko Hirose*[5] and Motomitsu Kitaoka*[6]

*[1] National Agricultural Research Center for the Hokkaido Region, National Agriculture and Food Research Organization
*[2] Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine
*[3] Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University
*[4] Graduate School of Biostudies, Kyoto University
*[5] Department of Life Style Studies, University of Shiga Prefecture
*[6] National Food Research Institute, NARO

ヒトミルクオリゴ糖（HMOs）によるビフィズス菌増殖作用は古くから知られていたが，詳細な作用機構は未解明である．最近の研究からいくつかのビフィズス菌種／亜種はHMOs代謝に関わる遺伝子セットを保持しHMOs培地で生育できることが示されているが，HMOs代謝能が実際の代謝経路と一致していない可能性が残されている．我々は，HMOsを炭素源とした乳児腸管によく見られるビフィズス菌種を培養し，HMOs各成分の消長を詳細に調べた．試験菌株としてBifidobacterium bifidum JCM1254, Bifidobacterium longum subsp. infantis JCM1222, Bifidobacterium longum subsp. longum JCM1217, Bifidobacterium breve JCM1192を用いた．培地中の糖は2-anthranilic acidにより標識し，順相HPLCで定量した．各成分の消長パターンは各菌種の持つ酵素を反映していた．B. bifidumは菌体外酵素でHMOsを分解しており，B. longum subsp. infantisではHMOsをそのまま菌体内に取り込むことが示唆された．B. longum subsp. longumおよびB. breveはlacto-N-tetraoseのみ資化した．興味深いことに，B. bifidumはHMOs分解物を増殖中に残し，他の種／亜種が利用できる可能性が示された．HMOsの主成分がタイプⅠ糖であること及び，乳児型ビフィズス菌がタイプⅠ糖を好むことは，ビフィズス菌とヒトの共進化を示唆している．

乳児型ビフィズス菌のヒトミルクオリゴ糖各成分の消費パターン

朝隈　貞樹*[1]，畑山　恵美*[2]，浦島　　匡*[2]，吉田永史奈*[3]，片山　高嶺*[3]，山本　憲二*[3]
熊谷　英彦*[3]，芦田　　久*[4]，広瀬　潤子*[5]，北岡　本光*[6]

*[1] 農研機構北海道農業研究センター
*[2] 帯広畜産大学
*[3] 石川県立大学・生物資源科学研究所
*[4] 京都大学大学院生命科学研究科
*[5] 滋賀県立大学人間文化学部
*[6]（独）農研機構食品総合研究所

The Journal of Biological Chemistry, 287 (1), 693-700 (2012)

An α-N-acetylgalactosaminidase from infant-associated bifidobacteria belonging to a novel glycoside hydrolase family 129 is implicated in an alternative mucin degradation pathway

Masashi Kiyohara*[1], Takashi Nakatomi*[1], Shin Kurihara*[1], Shinya Fushinobu*[2], Hideyuki Suzuki*[3], Tomonari Tanaka*[3]
Shin-ichiro Shoda*[4], Motomitsu Kitaoka*[5], Takane Katayama*[6], Kenji Yamamoto*[6] and Hisashi Ashida*[1]

*[1] Graduate School of Biostudies, Kyoto University
*[2] Department of Biotechnology, The University of Tokyo
*[3] Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology
*[4] Graduate School of Engineering, Tohoku University, *[5] National Food Research Institute, NARO
*[6] Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University

ビフィズス菌はヒトを含むほ乳類腸管深部に生息する．腸管深部にはムチン粘膜層が存在し，常在性細菌の定着場所になっている．我々は以前乳児型ビフィズス菌からムチン糖鎖分解及び代謝に関わると考えられる菌体外膜結合型endo-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（EnfBF）を同定した．EnfBFは胃粘膜に多く存在するコア1鎖（Gal β1-3GalNAcα1-Ser/Thr）に特異的である．腸管粘膜にはコア３鎖（GlcNAc β1-3GalNAcα1-Ser/Thr）が多く存在している．我々はBifidobacterium bifidum JCM 1254からTn抗原（GalNAcα1-Ser/Thr）分解性の新規α-N-アセチルガラクトサミニダーゼ（NagBb）を同定した．ヒトS字結腸の杯細胞の分泌するMUC2ムチンの主要四糖糖鎖構造はシアリルまたはガラクトシルコア3（Gal β1-3/4GlcNAc β1-3（Neu5Acα2-6）GalNAcα1-Ser/Thr）であり，これらの糖鎖は既に同定済みのビフィズス菌分泌型グリコシダーゼによりTn抗原まで分解される．NagBbは菌体内酵素であるので，ペプチド鎖を含んだTn抗原が何らかのトランスポーターにより菌他内に取り込まれ分解する物と考えられる．NagBbホモログは乳児型ビフィズス菌に保存されており，これらはムチン糖鎖分解経路として少なくとも2種対の異なる酵素系を利用していることが示された．NagBbは既知酵素とアミノ酸配列の相同性が低く新規糖加水分解酵素ファミリー129に属している．

新規糖加水分解酵素ファミリー129に属する乳児型ビフィズス菌由来α-N-アセチルガラクトサミニダーゼはムチン分解経路に関与する

清原　正志*[1]，中富　　毅*[1]，栗原　　新*[1]，伏信　進矢*[2]，鈴木　秀之*[3]，田中　知成*[3]
正田晋一郎*[4]，北岡　本光*[5]，片山　高嶺*[6]，山本　憲二*[6]，芦田　　久*[1]

*[1] 京都大学大学院生命科学研究科
*[2] 東京大学大学院農学生命科学研究科
*[3] 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科
[4] 東北大学大学院工学研究科，[5]（独）農研機構食品総合研究所
*[6] 石川県立大学・生物資源科学研究所

Journal of Applied Glycoscience, 59, 1, 1-12 (2012)

Synthesis of novel thioglycoside analogs as the substrates and/or the inhibitors of cellobiohydrolases

Takeshi Terauchi*, Yoshiyuki Koyama**, Sachiko Machida*, Takafumi Kasumi** and Shiro Komba*

* National Food Research Institute, NARO
** Enzymology and Molecular Biology Laboratory, Department of Agricultural and Biological Chemistry, Nihon University

セロビオヒドロラーゼの活性測定のために基質または阻害剤となる５種類のβ（１－４）チオオリゴ糖，O－β－D－glucopyranosyl－(1→4)－S－β－D－glucopyranosyl－(1→4)－4－deoxy－4－thio－D－glucopyranose (1: Glc-O-Glc-S-Glc)，S－β－D-glucopyranosyl－(1→4)－O－(4-deoxy－4－thio－β－D-glucopyranosyl)－(1→4)－D－glucopyranose(2: Glc-S-Glc-O-Glc)，S－β－D-glucopyranosyl－(1→4)－4－deoxy－4－thio－D－glucopyranose（3: Glc-S-Glc)，O－β－D-galactopyranosyl－(1→4)－S－β－D－glucopyranosyl－(1→4)－4－deoxy－4－thio-D－glucopyranose（4: Gal-O-Glc-S-Glc）and O－β－D-glucopyranosyl－(1→4)－S－β－D-glucopyranosyl－(1→4)－O－(4-deoxy-4-thio－β－D-glucopyranosyl)－(1→4)－D－glucopyranose（5: Glc-O-Glc-S-Glc-O-Glc）を合成した．トリフレートアクセプターはベンゾイル化とトリフレート化の２段階で合成した．Sグリコシド化の後，アシル保護基を脱保護し目的物を得た．こうして，５種類の目的物はいずれもわずか４段階で合成に成功した．

セロビオヒドロラーゼの基質または阻害剤となる新規なチオグリコシドの合成

寺内　　毅*，小山　善幸**，町田　幸子*，春見　隆文**，今場　司朗*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 日本大学　生物資源科学部

Journal of Bioscience and Bioengineering, 113 (6) 715-718 (2012)

Biochemical Characterization of L-Arabitol 2-Dehydrogenase from Pantoea ananatis

Yoshikiyo Sakakibara and Kyoko Torigoe

National Food Research Institute, NARO

植物病原菌であるPantoea ananatisにおいて，キシリトールデヒドロゲナーゼ（XDH）とL－アラビトールデヒドロゲナーゼ（LAD）の２種類の酸化還元酵素が，糖代謝に関与すると考えられる単一のオペロン上にコードされていることが見出された．XDHとLADを遺伝子組換えにより大量調製し，生化学的解析を行ったところ，LADはL－アラビトールの２位の炭素を酸化するL－アラビトール2－デヒドロゲナーゼであることが明らかとなり，短鎖酸化還元酵素ファミリーに属するL－アラビトール2－デヒドロゲナーゼの最初の報告となった．さらに，LADはL－アラビトールの他にも，L－トレイトール等の２位と３位の炭素がL－threo配置の糖アルコールに作用することがわかった．一方，XDHは２位と３位の炭素がD－threo配置の糖アルコールを基質としたことから，LADとXDHは相補的な基質特異性を有していることが明らかとなった．

パントエア・アナナティス菌由来のL－アラビトール2－デヒドロゲナーゼの生化学的解析

榊原　祥清，鳥越　香子

（独）農研機構食品総合研究所

The Journal of Biological Chemistry, 286 (22) 19943-19957 (2011)

Lipid peroxidation modification of protein generates Nε- (4-oxononanoyl) lysine as a pro-inflammatory ligand

Takahiro Shibata*[1], Yuuki Shimozu*[1], Chika Wakita*[1], Noriyuki Shibata*[2], Makio Kobayashi*[2], Sachiko Machida*[3]
Xiaochun Zhu*[4], Lawrence M. Sayre*[4] and Koji Uchida*[1]

*[1] Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University
*[2] Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University
*[3] National Food Research Institute NARO
*[4] Department of Chemistry, Case Western Reserve University

4－Oxo－2－nonenal (ONE)－リジン付加体に特異的なモノクローナル抗体の作製に成功し，ONE－リジン付加体が動脈硬化巣に存在すること，並びに，酸化LDL受容体LOX－1のリガンドとして機能することを明らかにした．

柴田　貴弘*[1]，下津　祐樹*[1]，脇田　知佳*[1]，柴田　亮行*[2]，小林真紀子*[2]，町田　幸子*[3]
ツー・キアカン*[4]，サイラ・ローレンス*[4]，内田　浩二*[1]

*[1] 名古屋大学・農学部
*[2] 東京女子医大
*[3]（独）農研機構食品総合研究所
*[4] Department of Chemistry
カーサ　ウエスタン大学

The Biochemical Journal, 442, 171-180 (2012)

Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1

Miyuki Kumano-Kuramochi*, Yuuki Shimozu**, Chika Wakita**, Mayumi Ohnishi-Kameyama*, Takahiro Shibata**, Shigeru Matsunaga*
Yuko Takano-Ishikawa*, Jun Watanabe*, Masao Goto*, Qiuhong Xie*, Shiro Komba*, Koji Uchida** and Sachiko Machida*

*[1] National Food Research Institute NARO
*[2] Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University

脂質過酸化反応の結果生じるアルデヒド修飾により，酸化LDLの構成分子であるアポBに4-hydroxy-2-nonenal-ヒスチジン付加体が生成する．この付加体が動脈硬化の初期過程に関与する受容体であるLOX-1のリガンドであることを明らかにした．

4-hydroxy-2-nonenal-ヒスチジン付加体はヒト酸化LDL受容体LOX-1のリガンドとして機能する

倉持（熊野）みゆき*，下津　祐樹**，脇田　知佳**，亀山（大西）眞由美*，柴田　貴弘**，松永　　茂*
石川（高野）祐子*，渡辺　　純*，後藤　真生*，謝　　秋宏*，今場　司朗*，内田　浩二**，町田　幸子*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 名古屋大学農学部

Applied and Environmental Microbiology 77 (22). 8181-8183. (2011)

Scandium Stimulates the Production of Amylase and Bacilysin in Bacillus subtilis

Takashi Inaoka* and Kozo Ochi**

* National Food Research Institute, NARO
** Hirosima Institute of Technology

枯草菌の菌体外酵素及び抗生物質生産における希土類元素の効果について調査した結果，増殖培地へのスカンジウムの添加は培養後期において菌体外酵素であるアミラーゼやプロテアーゼ，抗生物質であるバシリシンの生産能を高めることが判明した．しかしながら，他の希土類元素ではこのような効果は認められなかった．レポーター遺伝子によるプロモーター活性測定及び定量リアルタイムPCRによる転写産物量の比較を行なったところ，スカンジウム無添加の場合と比較して培養後期の細胞においてアミラーゼ遺伝子の発現誘導が観察された．また，バシリシン生合成遺伝子の発現は定常期初期では変化は認められないが，培養後期においても発現が高レベルで維持されていることがわかった．これらの結果は，スカンジウムが枯草菌の定常期後期においてこれら遺伝子発現に直接又は間接的に影響を及ぼすことを示している．

スカンジウムは枯草菌においてアミラーゼ及びバシリシン生産を高める

稲岡　隆史*，越智　幸三**

*（独）農研機構食品総合研究所
** 広島工業大学

ChemBioChem, 12 (18), 2767-2773 (2011)

Epoxyquinone Formation Catalyzed by a Two-Component Flavin-Dependent Monooxygenase Involved
in Biosynthesis of the Antibiotic Actinorhodin

Takaaki TAGUCHI*[1], Susumu OKAMOTO*[2], Kimiko HASEGAWA*[3], Koji ICHINOSE*[1]

*[1] Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Rigaku Corporation

Streptomyces coelicolor A3（2）の生産するactinorhodin（ACT）は，benzoisochromanequinone（BIQ）系抗生物質に属する芳香族ポリケタイド化合物である．本化合物の生合成に関与するActVA-5は，フラビン還元酵素ActVBと共にフラビン依存型二成分系モノオキシゲナーゼ（ActVA-5/ActVB）として機能し，６位への酸素導入によるキノン形成を触媒する．今回我々は，dihidrokalafunginを基質とした場合，本酵素系が６位酸化とは別の活性を示すことを見いだした．２種類の酵素反応生成物についてNMR分析およびX結晶構造解析を行い，それらの構造を5S, 14R-epoxy-kalafunginおよび5R, 14S-epoxy-kalafunginであると決定した．この結果は，ActVA-5/ActVB酵素系がエポキシ化活性を有することを示す．

Actinorhodin生合成に関わる二成分系モノオキシゲナーゼによるエポキシキノン形成反応

田口　貴章*[1]，岡本　　晋*[2]，長谷川仁子*[3]，市瀬　浩志*[1]

*[1] 武蔵野大学薬学研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] 株式会社リガク

Mycoscience, 52 (6), 431-435 (2011)

Molecular breeding of a novel Coprinopsis cinerea strain possessing a heterologous laccase gene, lccK, driven by a constitutive promoter

Hajime Muraguchi*, Manami Kondoh*, Yasuhiro Ito**, Sonoe O. Yanagi*

* Akita Prefectural University
** National Food Research Institute (NARO)

担子菌ヒラタケ（Pleurotus ostreatus）のラッカーゼ遺伝子（LccK）を，担子菌ネナガノヒトヨタケ（ウシグソヒトヨタケ；Coprinopsis cinerea）で異種発現させるために，ネナガノヒトヨタケβチューブリン遺伝子のプロモーターに結合させ，ネナガノヒトヨタケに遺伝子導入を行った．得られた組換え処理系統について，後代の分離解析，酵素のnative-PAGE解析，酵素の基質特異性解析，発現解析を行い，ネナガノヒトヨタケ組換え体がヒラタケLccK酵素を分泌していることを明らかにできた．従って，ヒラタケLccK遺伝子はネナガノヒトヨタケ内で，正常に，スプライシングが生じ，細胞外分泌シグナルが機能していることが示唆された．ラッカーゼを継続的に発現する組換え体は，芳香族化合物の分解に利用できるかも知れない．

継続的に発現誘導するプロモーターに接続した異種ラッカーゼ遺伝子（lccK）を持つ新規ネナガノヒトヨタケ系統の分子育種

村口　　元*，近藤　愛美*，伊藤　康博**，柳　　園江*

* 秋田県立大
**（独）農研機構食品総合研究所

Plant Physiology, 158 (1), 439-450 (2012)

MACROCALYX and JOINTLESS Interact in the Transcriptional Regulation of Tomato Fruit Abscission Zone Development

Toshitsugu Nakano*[1], Junji Kimbara*[2], Masaki Fujisawa*[1], Mamiko Kitagawa*[2], Nao Ihashi*[1], Hideo Maeda*[3]
Takafumi Kasumi*[4] and Yasuhiro Ito*[1]

*[1] National Food Research Institute, (NARO)
*[2] Research Institute, Kagome Co., Ltd.
*[3] National Institute of Crop Science (NICS) (NARO)
*[4] Nihon University

器官脱離とは，葉，花，果実といった植物器官が老化したり，傷害をうけたり，成熟したときに，植物がこれら器官を植物本体より落とすプロセスをいう．器官脱離は，あらかじめ決まった場所に形成される離層とよばれる組織から起こる．果実の脱離制御は，農業上重要であるにもかかわらず，離層形成の制御機構はよくわかっていない．本報では，トマト果柄の離層形成を制御する新規転写因子遺伝子について報告する．私たちは，萼サイズの制御因子として知られていたMADS-box転写因子のMACROCALYX（MC）が，トマト果柄の離層形成に必要であることを明らかにした．MCは，シロイヌナズナの鞘の裂開帯の形成を制御するMADS-box転写因子FRUITFULと高い相同性を示す．MCは，果柄の離層形成制御因子であるMADS-box転写因子JOINTLESSと相互作用し，ヘテロ二量体を形成することで，特異的DNA配列へ結合できるようになることが判明した．また，脱離前の花柄を用いた遺伝子発現解析によって，MCとJOINTLESSが，植物ホルモン，細胞壁修飾，脂質代謝に関連する遺伝子や転写因子遺伝子の発現を制御していることが明らかになった．MCとJOINTLESSが制御している転写因子遺伝子のなかには，WUSCHEL（WUS），REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS（RAX），CUP-SHAPED COTYLEDON（CUC），LATERAL SUPPRESSOR（LAS）のホモログ遺伝子がみつかった．WUS, RAX, CUC, LASは，シロイヌナズナにおいて茎頂分裂組織の維持，脇芽分裂組織の形成，組織境界部の決定を制御している遺伝子である．トマトでは，WUS, RAX, CUC, LASのホモログ遺伝子が，花柄の離層特異的に発現していることから，これら遺伝子が離層の形成制御に関わる可能性が示された．

転写因子MACROCALYXとJOINTLESSは，複合体を形成してトマト果柄の離層形成を制御する

中野　年継*[1]，金原　淳司*[2]，藤澤　雅樹*[1]，北川麻美子*[2]，伊橋　　順*[1]，前田　英郎*[3]，春見　隆文*[4]，伊藤　康博*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] カゴメ総研
*[3]（独）農研機構作物研究所
*[4] 日本大

Planta, 235 (6), 1107-1122 (2012)

Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses

Masaki Fujisawa*, Yoko Shima*, Naoki Higuchi**, Toshitsugu Nakano*, Yoshiyuki Koyama**, Takafumi Kasumi**, Yasuhiro Ito*

* National Food Research Institute, NARO
** Department of Agricultural and Biological Chemistry, Nihon University

トマトの果実成熟制御因子であるMADS-box型転写因子RINが直接的に転写制御している標的遺伝子を同定するために，トマト（Solanum lycopersicum）正常株およびRIN変異株の成熟前後の果実についてマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い，RIN依存的に発現が上昇する遺伝子を342個，下降する遺伝子を473個見出した．その内主な成熟関連遺伝子７個について，抗RIN抗体を用いたクロマチン免疫沈降（ChIP）と定量PCRによりプロモーター領域へのRINの結合を明らかにし，これらがRINの標的遺伝子であることを示した．これらの遺伝子は，果実の軟化・香気成分合成・防御応答や転写制御に関わっており，エチレン合成も含めRINが成熟の様々な現象を直接制御していることが遺伝子レベルで示された．特に成熟に関わる転写因子遺伝子CNRやTDR4がRINの標的であるという発見は，成熟制御カスケードを理解する上で重要である．

トランスクリプトーム解析およびクロマチン免疫沈降解析により同定されたトマト果実成熟制御因子RIN標的遺伝子

藤澤　雅樹*，嶋　　羊子*，樋口　直樹**，中野　年継*，小山　善幸**，春見　隆文**，伊藤　康博*

*（独）農研機構食品総合研究所
** 日本大学　生物資源科学部

食品総合研究所研究報告，76，39-43（2012）

蛋白質の溶液Ｘ線散乱測定における２次元データの評価

渡邊　　康*，猪子　洋二**

* 農研機構食品総合研究所
** 大阪大学大学院基礎工学研究科

食品素材成分である蛋白質を有効利用するため，溶液中の蛋白質の特性を解析する技術の開発は重要である．本研究では，蛋白質溶液についての溶液Ｘ線散乱測定における２次元データを評価した．２次元データの１次元データへの変換において，垂直方向の扇形（０時と６時方向の±30°），水平方向の扇形（３時と９時方向の±30°），および全方向同心円の積算データは，測定された散乱角領域において良好な一致を示した．さらに，全方向同心円の積算データの中角領域は，同測定条件下の１次元検出器による測定データと比較して，きわめてばらつきが小さいことが明らかとなった．これらの結果は，蛋白質水溶液のような分散溶液の静的測定では，疑似点収束光学系における溶液Ｘ線散乱測定システムに２次元検出器を導入することのメリットが十分にあることを示している．

An assessment study on two-dimensional X-ray scattering data for protein solutions

Yasushi Watanabe* and Yoji Inoko**

* National Food Research Institute, NARO
** Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75,2415-2417 (2011)

Effect of lime pretreatment of brown midrib sorghums

Tomoko Maehara*[1], Tomoyuki Takai*[2], Hiroaki Ishihara*[3], Makoto Yoshida*[3], Kiyoharu Fukuda*[3], Mitsuru Gau*[2] and Satoshi Kaneko*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Forage Crop Breeding Unit, National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region
*[3] Department of Environmental and Natural Resource Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

ソルガムの酵素糖化におけるライム前処理の影響を検討した．ほとんどの条件下で，ブラウンミッドリブ（ｂｍｒ）変異を有するソルガムの糖化は遺伝的に同じ背景を有する野生型のソルガムに比べ，高い糖化率を示した．この結果は，ｂｍｒ変異を有するソルガムは野生型に比べて前処理条件をマイルドにすることが可能であり，ｂｍｒはバイオマスの前処理コストを低減するために有用な性質であることを示唆する．

ブラウンミッドリブソルガムに対するライム前処理の影響

前原　智子*[1]，高井　智之*[2]，石原　啓明*[3]，吉田　　誠*[3]，福田　清春*[3]，我有　　満*[2]，金子　　哲*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2]（独）農研機構九州沖縄農業研究センター
*[3] 東京農工大学

Carbohydrate Research, 346, 1029-1036 (2011)

Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of Coffea arabica instant coffee powder

Mária Matulová*[1], Peter Capek*[1], Satoshi Kaneko*[2], Luciano Navarini*[3], Furio Suggi Liverani*[3]

*[1] Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences
*[2] National Food Research Institute, NARO
*[3] Illycaffè s.p.a., Research & Innovation

インスタントコーヒーより調製したアラビノガラクタン-プロテイン（AGP）をマイルドな酸及び酵素によって分解した．得られた糖はゲル濾過とHPLCにより分離し，その構造をNMRにより解析した．マイルドな酸分解によって得られたオリゴ糖はアラビノフラノースを全く含まなかったが，酵素分解により得られたオリゴ糖にはアラビノフラノースが含まれ，２糖，３糖，４糖として存在した．いずれの場合も，アラビノフラノースは末端に存在し，ガラクトースの３位の水酸基，６位の水酸基または両方に結合していることが示唆された．マイルドな酸処理または酵素処理によって得られた高分子の糖鎖についても解析を行った．

インスタントコーヒーのアラビノガラクタン-プロテイン由来オリゴ糖の構造

マリア・マツロバ*[1]，ピーター・チャペック*[2]，金子　　哲*[2]，ルシアノ・ナバリニ*[3]，フリオ・スギ・リベラニ*[3]

*[1] スロバキア化学研究所
*[2]（独）農研機構食品総合研究所
*[3] イリカフィ

Journal of Cereal Science, 53, 244-249 (2011)

An arabinogalactan-protein from whole grain of Avena sativa L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins

Esther M. Göllner*, Hitomi Ichinose**, Satoshi Kaneko**, Wolfgang Blaschek*, Birgit Classen*

* Pharmaceutical Institute, Department of Pharmaceutical Biology, Christian-Albrechts-University of Kiel
** National Food Research Institute, NARO

β-グルコシルヤリフ試薬による沈降を２回行うことによりオート麦全粒より初めてアラビノガラクタン-プロテイン（AGP）を単離し，タンパク部分と糖鎖部分の解析を行った．高分子の糖鎖部分はガラクトース（63.0% w/w）とアラビノース（32.8% w/w）を多く含んだが，ウロン酸は検出されなかった．AGPの糖結合解析結果とエキソ-1,3-ガラクタナーゼ処理によるプロダクトの構造解析により，本AGPは1,3-ガラクタンを主鎖とし，末端にアラビノフラノースを有する短鎖の1,6-ガラクタン側鎖で構成させることを示唆した．タンパク部分はAGPに特徴的なアミノ酸であるアラニン，ヒオドロキシプロリン，セリンを多く含んだ．単離したAGPの分子量は83 kDaであり，タンパク質部分のアルカリ分解で遊離された糖鎖のサイズは約７kDaだった．この様にオートのAGPの構造は花盛りの網枝様タイプのアラビノガラクタン-プロテインの構造をしていた．

オート麦全粒由来アラビノガラクタン-プロテインは花盛りの網枝様タイプのアラビノガラクタン-プロテインに属する

エステル・ゴルナー*，一ノ瀬仁美**，金子　　哲**，ウォルフガング・ブラスチェック*，ブルジット・クラッセン*

* クリスチャン-アルブレクツ大学
**（独）農研機構食品総合研究所

Process Biochemistry, 47,358-365 (2012)

Structure-based engineering of glucose specificity in a family 10 xylanase from Streptomyces olivaceoviridis E-86

Hitomi Ichinose*[1], Shaghik Diertavitian*[2], Zui Fujimoto*[3], Atsushi Kuno*[4], Leila Lo Leggio*[2] and Satoshi Kaneko*[1]

*[1] National Food Research Institute, NARO
*[2] Biophysical Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Copenhagen
*[3] National Institute of Agrobiological Resources
*[4] Research Center for Glycoscience, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

基質特異性は最も重要な酵素の特性の一つである．我々は糖加水分解酵素の基質特異性を研究する一つのモデルとしてストレプトマイセス　オリバセオビリディス由来ファミリー10キシラナーゼについて研究を行っている．サブサイト−1と−2における糖選択制をキシロースからグルコースへ改変するため，７種類の変異体酵素をデザインした．変異体のデザインはサブセット１，２としてファミリー10キシラナーゼにおいて区別できるサブサイト−1におけるトリプトファン残基の可動性と周りの環境への影響も考慮した．Q88A/R275A 変異体はｐ−ニトロフェニルセロビオシドとｐ−ニトロフェニルキシロビオシドの分解性を比較したところ，グルコースに対する選択制が最も向上していた．Q88A/R275A 変異体の立体構造を解析したところ，Trp274が Arg275との相互作用がなくなったことから野生型酵素に比べて大きく動けるようになり，また，Q88A の変異により側鎖が短くなったことから，グルコースのＣ６位が入るスペースが生じ，ｐ−ニトロフェニルセロビオシドに対するＫｍ値が低くなったが，Q88の変異により，kcat が低下したことが示唆された．Q88A/R275A 変異体に更に変異を加えたところ，最もグルコースに対する選択制が高まった変異体では，ｐ−ニトロフェニルセロビオシドに対する活性が，野生型酵素に比べ，5.2倍改善されていた．

ストレプトマイセス　オリバセオビリディス由来ファミリー10キシラナーゼの
グルコース選択制の構造を基にしたエンジニアリング

一ノ瀬仁美*[1]，シャギック・ディタビティアン*[2]，藤本　　瑞*[3]，久野　　敦*[4]，レイラ・ロ・リッジョ*[2]，金子　　哲*[1]

*[1]（独）農研機構食品総合研究所
*[2] コペンハーゲン大学
*[3] 独立行政法人農業生物資源研究所
*[4] 独立行政法人産業総合技術研究所

The Journal of Biological Chemistry, 286, 15483-15495 (2011)

The structure and function of an arabinan-specific alpha-1,2-arabinofuranosidase identified
from screening the activities of bacterial GH43 glycoside hydrolases

Alan Cartmell*[1, 2], Lauren S. McKee*[1, 2], Maria J. Pen˜ a*[2], Johan Larsbrink*[3], Harry Brumer*[3], Satoshi Kaneko*[4]
Hitomi Ichinose*[4], Richard J. Lewis*[1], Anders Viksø-Nielsen*[5], Harry J. Gilbert*[1, 2] and Jon Marles-Wright*[1]

*[1] Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, The Medical School
*[2] Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia
*[3] School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, AlbaNova University Centre
*[4] National Food Research Institute, NARO
*[5] Novozymes A/S,

植物の細胞壁の多様な構造に対して，微生物は複雑な構造に対する一連の糖加水分解酵素を生産し，分解する．これらの酵素はアミノ酸配列，機能，構造を基盤とするファミリーに分類されている．いくつかの微生物のゲノム遺伝子配列を解析すると植物細胞壁を分解する微生物には非常に多くの糖加水分解酵素ファミリー43（GH43）に分類される配列が存在する．そこで，我々は腐生性土壌細菌 Cellvibrio japonicus と人の腸内細菌である Bacteroides thetaiomicron の有する GH43酵素の生化学的な特性について報告する．そのデータは C. japonicus はアラビナンを分解するために主にエキソ型の酵素を利用するが，B. thetaiotaomicron はエンド型酵素と側鎖を取り除く酵素をコンビネーションで利用していることを示唆する．両菌株ともこれまでに報告のないアラビナン特異的α−1,2−アラビノフラノシダーゼをアラビナン分解に利用していることが示された．本酵素はアラビナンに存在するα−1,2−結合を分解し，一般的なアラビノフラノシダーゼが作用できないダブルブランチの側鎖に対しても作用する．C. japonicus 由来アラビナン特異的α−1,2−アラビノフラノシダーゼの結晶構造は５つのβ−シートを基盤とする羽根状構造が組み合わさった様なフォールディングをしており，クレフト部分が主鎖を識別することで，アラビナンに対する選択制を作り出し，活性部位となるポケット構造にはα−1,2−結合のアラビノフラノースのみが入り得る構造を作り出していた．また，ダブルブランチの場合にはα−1,3−結合のアラビノフラノースが入り得るスペースが空いていることが観察された．

バクテリア由来 GH43糖加水分解酵素のスクリーニングにより見出された
アラビナン特異的α−1,2−アラビノフラノシダーゼの構造と機能

アラン･カートメル*[1, 2]，ローレン･マッキー*[1, 2]，マリア･ペナ*[2]，ヨハン･ラースブリング*[3]，ハリー･ブルーマー*[3]，金子　　哲*[4]
一ノ瀬仁美*[4]，リチャード･ルイス*[1]，アンダース･ビコソ−ニールセン*[5]，ハリー･ギルバート*[1, 2]，ジョン･マーレス−ライト*[1]

*[1] ニューカッスル大学
*[2] ジョージア大学
*[3] 王立工科大学
*[4]（独）農研機構食品総合研究所
*[5] ノボザイム

The Journal of Biological Chemistry, 286, 27848-27854 (2011)

Endo-beta-1,3-galactanase from winter mushroom Flammulina velutipes

Toshihisa Kotake*[1], Naohiro Hirata*[1], Yuta Degi*[1], Maki Ishiguro*[2], Kiminari Kitazawa*[1], Ryohei Takata*[1], Hitomi Ichinose*[3]
Satoshi Kaneko*[3], Kiyohiko Igarashi*[2], Masahiro Samejima*[2] and Yoichi Tsumuraya*[1]

*[1] Faculty of Science, Saitama University
*[2] Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo
*[3] National Food Research Institute, NARO

アラビノガラクタン - プロテイン（AGP）は高等植物の細胞表層に存在するプロテオグリカンである．AGPの糖鎖部分は1,3-ガラクタンを主鎖とし，アラビノース等の糖で修飾された1,6-ガラクタン側鎖を有する．本研究では，初めてFvEn3GALと命名したエンド-β-1,3-ガラクタナーゼをエノキタケより精製するとともに遺伝子をクローニングした．本酵素はβ-1,3-ガラクタンを加水分解したが，β-1,3-グルカン，β-1,3-: 1,4-グルカン，キシログルカン，アガロースを分解しなかった．β-1,3-ガラクトヘキサオースに作用させた場合，様々な長さのβ - 1,3 - ガラクトオリゴ糖を初期反応生成物として生産したことから，本酵素はエンド型にβ-1,3-ガラクタンを分解することが示唆された．系統樹解析により，本酵素は糖加水分解酵素ファミリー16において，既知のエンド-1,3-グルカナーゼやエンド-1,3: 1,4-グルカナーゼと明確に区別できるサブグループを形成するすることが明らかとなった．触媒残基と予想されるファミリー16に保存されているグルタミン酸とアスパラギン酸の変異により，本酵素は活性を失った．これらの結果はFvEn3GALは極めて厳密な基質特異性を有するファミリー16エンド-β-1,3-ガラクタナーゼであることを示唆する．

エノキタケ由来エンド-β-1,3-ガラクタナーゼ

小竹　敬久*[1]，平田　尚弘*[1]，出木　雄太*[1]，石黒　真希*[2]，北澤　仁成*[1]，高田　遼平*[1]，一ノ瀬仁美*[3]
金子　　哲*[3]，五十嵐圭日子*[2]，鮫島　正浩*[2]，円谷　陽一*[1]

*[1] 埼玉大学
*[2] 東京大学
*[3]（独）農研機構食品総合研究所

付　録

「食品総合研究所研究報告」の編集について

1　方針

⑴ 独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究所　食品総合研究所研究報告（以下「研究報告」という.）には原著（報文，研究ノート及び技術報告）と学会誌等発表論文の抄録を登載する．原著は他誌に未発表のものに限る．研究ノートは新知見を含むが報文にまとめ得ないもの，技術報告は報文にまとめ得ないが食品分野の研究及び産業に寄与する有用なデータを含むものとする.

⑵ 原著論文については，編集委員が選定した査読者による査読を行う.

⑶ 原著論文の投稿に際しては，事前に所属領域長の承認及び内容の確認を得て行う.

⑷ 当研究所の職員が学会誌に発表した研究論文は，抄録として漏れなく登載することとする.

⑸ 当所の国連大学生の研究成果は，「国連大学生研究成果」抄録として登載する.

⑹ 研究報告の発行回数は，年１回程度とする.

⑺ その他，ここに定められていない事項は編集委員会で決定する.

2　原稿の提出部数

⑴ 原著原稿は正１部を提出し，電子ファイルを併せて提出する．なお，図及び写真で電子化できないものは，正原稿とは別に原図１部を提出する.

⑵ 抄録原稿は原稿１部の他，論文集として図書室保存用の別刷り１部を別途提出する.

⑶「国連大学生研究成果」抄録原稿は原稿１部を提出する.

⑷ 最終原稿は，電子化ファイルを提出する．ただし，図表等が電子化されていない場合は，この限りではない.

⑸ 原著については，原稿，原稿の電子ファイルともに，著者，事務局双方でバックアップを保管するものとする.

3　抄録原稿の記載要領抄録の構成は，学会誌名，巻・号，頁，発行年，題名，著者名，著者所属，論文要旨(和)及びキーワードとする.

⑴ 題名と著者名は日本語及び外国語を併記する.

⑵ キーワードは，５個を限度とする.

なお，外国語で書かれたキーワードは，外国語の後に日本語を括弧して入れることとする.

4　「国連大学生研究成果」抄録原稿の記載要領抄録の構成は，題名，著者名，所属研究室名，アドバイザー名，研究期間及び成果の要旨とする.

5　投稿論文の記載要領

⑴ 論文の構成

ア　報文と技術報告の構成は，表紙（表題・著者名等を記載），英文要旨，本文，図・写真及び表とし，本文は緒言（記述にあたっては緒言の文字は省略），実験方法，実験結果，考察（実験結果及び考察としても可），要約，文献とする.

イ　研究ノートの構成は，本文の実験方法，実験結果，考察等の構成区分見出しを必要とせず直接必要な事項の字句を見出しにしてもよい.

なお，その他の構成は報文と同様とする.

ウ　著者の所属名称を記載する．和文の場合は，１ページ目に著者の所属名称を日本語，英語の両方で記載する．英文の場合は，１ページ目に英語で，和文要旨内には日本語で記載する.

⑵ 原稿の枚数

原稿はＡ４判横組み・縦置き（26字×23行＝598字）で作成し，報文及び技術報告は図表を含め20枚（刷り上がり６頁）程度，研究ノートの原稿枚数は10枚（刷り上がり３頁）以内とする．

ただし，編集委員会で認めた場合はこの限りではない．

また，原稿には通し番号を付ける．

⑶ 文章及び文字

ア 文章は，ひらがな，常用漢字，現代仮名づかい，「である」調とし，できるだけ簡潔，平易に記述する．

イ 専門用語は，原則として文部省学術用語審議会編「学術用語集」による．略号または記号を用いるときは，最初に用いる箇所で正式の名称を記し，括弧内に略号や記号を示す．

ウ 本文中の物質名や術語などは学術用語集に基づいた名称を用い，分子式やアルファベット表記を用いることは避ける．外国の人名や会社名はアルファベット表記とするが，周知の術語になっているものはカタカナ書きとする．

エ 誤読，誤植のおそれのある文字，記号，字体は，黒鉛筆で原稿に適切な指示を書き入れる．

オ その他の文字，記号，物理量等の表記については，「日本食品科学工学会誌」投稿論文記載要領に準ずる．

⑷ 図表及び写真

ア 図と表は最小限にとどめ，同一内容のものはいずれか一方とする．図は写真印刷に適した鮮明なものを作成し，タイトルは活字で入れる．

イ 写真は原則として白黒で印刷する．アート紙，またはカラー写真を希望する場合は編集委員会に申し出る．

⑸ 文献

文献の記載法については，「日本食品科学工学会誌」投稿論文記載要領に準ずる．なお，引用文献は本文の最後に一括して番号順に列記し，本文中の該当人名または事項の右肩に上付き文字で1)2)のように通し番号を付ける．

⑹ 英文要旨

原稿は上下左右に余白をとり，ダブルスペースで，タイプまたはワープロにより印字する．語数は報文と技術報告は200語程度，研究ノートは100語程度とする．

⑺ 英文の投稿論文記載要領は特に定めないが，上記和文論文の記載要領を参考に用紙の上下左右に余白をとり，ダブルスペースでタイプまたはワープロにより印字する．

なお，英文校閲は原則として著者の責任で行うものとする．

英文要旨には和文要旨を併せて記載する．

6 校正

著者校正は原則として再校までとする．校正の際の字句の書換え及び追加は認めない．校正は赤ペンを使用し，校正の約束ごとは原則として日本印刷学会の方式に従う．

7 体裁

⑴ Ａ４判，本文２段組とする．

⑵ 装丁，奥付，目次，題名，著者名，英文要旨，見出し等の体裁は，編集委員会で変更しない限り従前どおりとする．

論文の受付日および受理日を原稿欄外に記載する．

改正　平成21年５月28日

改正　平成21年12月28日

和文誌

「日本食品科学工学会誌」
投稿論文記載要領

（平成25年4月改正）

1　はじめに

この記載要領は投稿規程により，論文投稿に当たって原稿を執筆するさいの指針として作成したものである．執筆に当たっては投稿規程とともによく読んで，体裁の整った理解しやすい論文を作成するように努めていただきたい．

2　投稿論文

2.1　用紙はA4判とし，縦長に置き，上下左右に各3cm程度の余白を設け，11ポイント程度の字の大きさで26字×27行（＝702字）を横書きする．

2.2　投稿論文の構成と提出部数

投稿論文の構成は，⑴表紙，⑵英文要旨およびその和訳，⑶本文，⑷表，⑸図（写真を含む），⑹図（写真を含む）の説明原稿とする．

著者は投稿原稿の完全な控えを手元に保存する．なお審査の過程で変更があった場合は，それらの控えもすべて保存する．

3　投稿方法

論文の投稿はオンライン投稿システムの指示に従い行う．（URL : http://www.editorialmanager.com/nskkk/）

4　表紙

4.1　表紙には**4.5**の例のように，和文で欄外見出し，題名，著者名，所属，キーワード（日本語），脚注の順に書く．

4.2　欄外見出しは著者名（姓のみ，2名の場合は併記し，3名以上の場合は「筆頭著者の姓・他」とする）に続いて，題名を**15字**以内にまとめて書く．なお，欄外見出しは会誌の表紙題名としても使用される．

4.3　共著者の所属が筆頭著者のそれと異なる場合は，共著者の氏名の右肩に「[1]」「[2]」「[3]」を付け，所属（著者の正式な所属機関名）と対応させる．内容に関する質疑，別刷り請求等のための連絡先代表者を指定する場合は，当該氏名に「*」を付け，脚注と対応させる．

4.4　脚注には著者の所属機関の郵便番号と住所を書く．なお，連絡先代表者を指定した場合，「連絡先（Corresponding author）」としメールアドレスを記載する．

4.5　表紙記載例

〔欄外見出し〕
食品・他 : 麹菌および鶏卵の量と魚醤油の品質

醤油麹量と鶏卵添加量がイカおよびイワシ魚醤油の品質に及ぼす影響†
食品花子[1]，深海潜太[2]，水産勝尾[2*]，
畜産育雄[3]，農業営子[3]
[1]独立行政法人機能食材研究所
[2]太平洋大学農林水産学系
[3]全国県農業畜産試験場
キーワード : 5語以内

………………………〔脚　注〕………………………

[1]〒929-0808 能登県いしる市薄口台4-5-67
[2]〒288-9999 西南県南総市黒潮岬3-2-1
[3]〒123-4567 全国県風見鶏市大豆が丘5432-10
*連絡先（Corresponding author），abcd@efg.hi.jk

5　英文要旨およびその和訳

5.1　英文要旨は報文および技術論文では，200語程度とし，研究ノートおよび速報では**100**語程度とする．

5.2　下記**5.4**の例のように，題名，次いで3行あけて著者名（名，姓の順とし，先頭文字のみ大文字とする），所属機関名および住所，所在地，次に1行あけて要旨本文を書く．

5.3　英文要旨には研究の目的，方法，結果および結論を述べる．キーワードを5語以内で付ける．

5.4 英文要旨記載例

Effects of Concentrations of “Shoyu Koji” and Egg on Quality of Fish Sauces of Squid and Sardine

Hanako Shokuhin[1], Senta Fukami[2], Katsuo Suisan[2*], Ikuo Chikusan[3] and Eiko Nogyo[3]
[1]National Functional Food Stuff Institute, 4-5-67 Usukuchidai, Ishiru, Noto 929-0808
[2]Institution of Agriculture, Forestry and Fisheries, Taiheiyou University, 3-2-1 Kuroshiomisaki, Nansou, Seinan 288-9999
[3]Zenkoku Prefectural Agricultural and Livestock Experiment Station, 5432-10 daizugaoka, kazamidori, Zenkoku 123-4567

Fish sauces were prepared, using Japanese squid and sardine caught in the sea near Oni-ga-shima island. The quality of fish sauces was studied by changing Shoyu Koji and Ukokkei-egg concentrations during fermentation.……

Keywords :

6 本文

6.1 本文の構成

6.1.1 報文および技術論文

構成区分は原則として緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない），実験方法，実験結果，考察（「実験結果および考察」としてもよい），要約，謝辞（必要な場合．記述に当たっては「謝辞」という字句は用いない），文献とする．記述に当たっては，構成区分の見出し字句の前後は1行ずつあけ，見出し字句は行の中央に書く．

構成区分中の大見出し，中見出しおよび小見出しは，それぞれ1，2，3，……，(1)，(2)，(3)，……，i)，ii)，iii)，……のように順次区別する．

中見出しまでは見出し字句をつけ，改行して文章を書き出す．小見出しは見出し字句をつけ，改行して文章を書くことを原則とするが，見出し字句のあとに「：」をつけて改行しないで文章を続けてもよい．見出し字句の最後にピリオドはつけない．

6.1.2 研究ノートおよび速報

構成区分見出しを必要とせず，緒言（記述に当たっては「緒言」という見出し字句は用いない），大見出し以下の区別で記述する．大見出しの見出し字句は原則として，直接必要な事項の字句を見出しとする．要約は大見出しにより，文献のみは構成区分見出しとする．

6.2 原稿の書き方

6.2.1 文章および文字

文章は平易かつ簡潔な「である」調とする．英字，数字は原則として半角とする．

6.2.2 専門用語は原則として文部科学省学術用語審議会編「学術用語集」による．略語又は記号を用いるときは，最初に用いる箇所で正式名称を書き，かっこ内に略語や記号を示す．

6.2.3 化合物名は原則としてIUPAC（国際純正応用化学連合）命名法に従い日本語で書く．

本文中では化学式を用いず，名称を用いて書く．長い化合物名の場合は，**6.2.2**に準じて略語を用いてもよい．また，化合物の名称として，一般に使用されるものを用いてもよい．

6.2.4 外国の人名，会社名などはアルファベット表記とする．ただし，例のように，周知の術語となっている人名はカタカナ書きでもよい．人名には敬称をつけない．

〔例〕　ケルダール分解法，　ソモギー法，　モール法，
　　　フェーリング液など

6.2.5 本文中に図，表を引用する場合，図，表が英文で書かれている場合は Fig. 1， Table 1とし，和文で書かれている場合は図1，表1とする．挿入位置を原稿用紙の右余白に［Fig. 1］，［Table 1］，［図1］，［表1］のように指示する．

6.2.6 物理量の記号および使用上の規約は，なるべくIUPACの勧告に従う．**付記1**および「物理化学で用いられる量・単位・記号」((社)日本化学会標準化専門委員会監修，朽津耕三訳，(講談社サイエンティフィック，東京)(1991)，要約版は，化学と工業，**42** (3)，498-506 (1989)．以下「IUPAC手引き」と略称）を参照する．

6.2.7 単位は**付記2**に準拠する．

6.2.8 動植物名は「文部科学省学術用語審議会編：学術用語集-動物編，植物編-大日本図書」「園芸学会編：園芸作物名編-養賢堂」などを参照し，カタカナ書きとする．学名は例1のように属（第1字目を大文字とする），種，変種，亜変種の部分にイタリック書体とする．

〔例 1〕 リンゴ→ *Malus domestica* Borkh.
　　　ウンシュウミカン→ *Citrus unshiu* Marc.

動植物体の加工品は〔例2〕のように原則としてひらがなまたは漢字を用いる．

〔例 2〕 コムギ→こむぎ粉，小麦粉
　　　サケ→塩さけ

6.2.9 微生物の名称および用語については「日本細菌学会用語委員会編：最新版英和和英微生物学用語集（菜根出版，東京都千代田区平河町1-8-13　和田ビル)」などによる．また微生物の学名は，例のようにイタリック書体とする．

〔例〕 微生物の属名のみを記載する場合
Aspergillus sp.
属・種名を記載する場合
Aspergillus oryzae
亜種・変種などを記載する場合

Bacillus cereus var. *mycoides*
特定の菌株などを記載する場合
Escherichia coli K-12

6.2.10 酵素の分離精製，諸性質の解明および応用に関する論文では，対象酵素の酵素番号および系統名を必要箇所に記述する．酵素番号および系統名は国際生化学連合（I.U.B.）酵素委員会報告 "Enzyme Nomenclature Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press (1984)" に準拠する．

〔例 1〕 グルコースイソメラーゼ（E.C. 5.3.1.5, D-Xylose ketol-isomerase）

論文で用いている酵素名が系統名と異なることから，酵素番号と系統名を記述する．

〔例 2〕 トリプシン（E.C. 3.4.21.4）

論文で用いている酵素名が系統名と同一のため，酵素番号だけを記述する．

6.2.11 数および数式については，**付記**および **6.2.6** の「IUPAC 手引き」を参照する．

6.2.12 引用文献番号は引用順に通し番号とし，本文中の該当箇所に「[1)2)]」，「[1)～3)]」，「[1)2)～4)6)]」のように上付きで指示する．本文の最後に「文献」としてまとめて書く．文献の書き方は**付記 4** に従う．引用する文献は直接参照したものに限る．

6.2.13 本文中の脚注は原則として用いないが，やむを得ない場合には本文中の項目の右肩に *，** を用い，例のように書く．

〔例〕

（本文）○○○○○○ *，○○○ …………………

（脚注）
* ○○○○○○○○ ……………………………
○○○○○ ……………………………………
○○○○ ……………………………………．

（本文）○○○○○ …………………………………

6.2.14 本文原稿は欄外にページ番号をつける．

6.2.15 各ページには行番号をつける．

7 図，写真および表

7.1 図と表は最小限にとどめ，同一内容のものはいずれか一方とする．

7.2 図・写真と表は，A4 サイズに原則ひとつずつとする．英文で図と表を作成する場合は，本文と独立して内容が理解できるような説明文を簡潔に書く．

7.3 図および写真

7.3.1 全ての図は，同一縮尺となるように調整し文字も印刷されたときを考慮し，大きさに気を付ける．印刷された文字の縦長が 1.5 mm 以下とならないようにする．グラフの縦軸の説明文字や物理量 / 単位は下方から上方へ向かって，横軸のそれは左から右へ横書きとする（ただし，目盛の数字はこの限りでない）．

カラーの図の印刷料金は，付表 1 による．

7.3.2 図・写真と表はコンピュータ画面上でも審査可能な鮮明なものとする．

また，これらは印刷時により解像度の高いものと差し替えることが可能である．カラー印刷も可能であるが，印刷費用は著者が負担する．カラー印刷料金については付表 1 による．

7.4 表

7.4.1 表は原則として A4 判を用いる．

7.4.2 表の題名は，表 1 又は Table 1 として表の上部に，説明などの注記は下部に書く．英文の場合，表題および表中の語句は最初の文字を大文字とし，以下は小文字とする．

8 掲載料

掲載料は付表 2 による

9 別刷

別刷の注文は「別刷注文書」によって行う．

別刷料金は付表 3 による．

10 その他

刷り上がり 1 頁は，本文の場合，702 字詰めの用紙 3 枚，図表原稿の場合，4 枚に相当する．

著者校正は一度だけ行う．英文要旨および英文で書かれた図表については，英文校閲をすませているので，これに従う．

〔付記 1〕 物理量とその記号

1.1 物理量の記号は，論文ごとに定義を明示してから用いる．記号はラテン文字又はギリシャ文字の 1 字（ただし pH は例外）とし，必要な場合に添字（ラテン文字，ギリシャ文字，アラビア数字，ローマ数字から選ぶ），その他の記号をつけることができる．

1.2 物理量の記号は，**イタリック体**（斜体）で印刷するが，添字についてはそれ自体が物理量を表わすときは**イタリック体**とし，そうでない場合は**ローマン体**（立体）とする．

1.3 物理量の値は，数値と単位の積である．物理量およびそれを表す記号は，特定の単位の採用を意味するものであってはいけない．（例 : "長さを l とする" は正しいが，"cm で測った長さを l とする" は誤りである）

1.4 物理量の記号は **6.2.6** の「IUPAC 手引き」の 2 章に記載されているものについては，できるだけこれに準拠する．記載されていない物理量の記号は，**1.2** の原則に従ってなるべく慣用されているものを用いる．

「IUPAC 手引き」の 2 章から抜粋した記号を以下に示す．

(1) 空間と時間

長　さ　length　l
高　さ　height　h
半　径　radius　r
直　径　diameter　d
面　積　area　A, As, S
体　積　volume　V
時　間　time　t
速　度　velocity　v, u, w, c

(2) 力学

質　量　mass　m
密　度　(mass) density　ρ
相対密度　relative density　d
力　force　F
圧　力　pressure　p, P
重　量　weight　G, W
運動エネルギー　kinetic energy　E_k, T, K
弾性率　modulus of elasticity　E
粘性率・粘度　viscosity　η, μ

(3) 一般化学

要素粒子の数　number of entities　N
物質量　amount of substance　n
モル質量　molar mass　M
相対分子質量　relative molar mass,　Mr
（分子量）　(molecular weight)
相対原子質量　relative atomic mass,　Ar
（原子量）　(atomic weight)
（溶質）B のモル濃度　amount (of substance) concentration of B,　c_B, 〔B〕
（略して B の濃度）(concentration of B)
解離度　degree of dissociation　α

(4) 熱力学

熱　heat　q, Q
仕　事　work　w, W
熱力学温度　thermodynamic temperature　T
熱容量　heat capacity　C_p, C_v
浸透圧　osmotic pressure　Π
（相対）活量　(relative) activity　a
平衡定数　equilibrium constant　K

(5) 電気と磁気

電　荷　electric charge　Q
電　流　electric current　I
電　位　electric potential　V
電気容量　capacitance　C
誘電率　permitivity　ε
抵　抗　resistance　R
抵抗率　resistivity　ρ

(6) 電磁放射

波　長　wavelength　λ
放射エネルギー　radiant energy　Q
透過率　transmittance, transmission factor　τ
吸光率　absorptance, absorption factor　α, R
吸光度（常用対数）(decadic) absorbance　A
吸光係数，吸収係数　absorption coefficient　ε
モル吸光係数（常用対数）　molar (decadic) absorption coefficient

〔付記 2〕 単位および単位記号の書き方

2.1　現在，単位は国際的に SI〔国際単位系を表す記号 (symbol) であって，略号ではないので，どの国語でも SI と書く〕単位に統一されつつあるが（参考文献 1）を参照），ここでは SI および慣用されている単位の主なものを記載した．論文の作成に当たっては，ここに記載した単位を選んで使用する．なお，ここに記載してない特定の量を表す単位については，著者が論文中に定義を明確に示してから用いる．

2.2　単位記号はローマン体（立体）で印刷し，複数を意味する場合でも形を変えてはいけない．又，文末にくるとき以外はピリオドをつけない．

〔例〕 5 cm とし，5 cms，5 cm.，5 cms. とはしない．

2.3　接頭語と単位記号の間にはスペースをおかない．

2.4　2 つの単位の積を示すときはセンターピリオドをおく．

〔例〕 N･m とし Nm としない．

2.5　2 つの単位の商はスラッシュ（/）又は割算の横線（—），あるいは $^{-1}$ で示す．/ は決して 2 回以上使用しない．

〔例〕 m/s, $\frac{\mathrm{m}}{\mathrm{s}}$, $\mathrm{m \cdot s^{-1}}$

J/(K･mol) または $\mathrm{J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}}$ とし，J/K/mol としない．

2.6　SI 接頭語

大きさ	接頭語	記号	大きさ	接頭語	記号
10^{-1}	デ　シ	d	10	デ　カ	da
10^{-2}	センチ	c	10^2	ヘクト	h
10^{-3}	ミ　リ	m	10^3	キ　ロ	k
10^{-6}	マイクロ	μ	10^6	メ　ガ	M
10^{-9}	ナ　ノ	n	10^9	ギ　ガ	G
10^{-12}	ピ　コ	p	10^{12}	テ　ラ	T
10^{-15}	フェムト	f	10^{15}	ペ　タ	P
10^{-18}	アット	a	10^{18}	エクサ	E

2.7　単位と単位記号の表

表中の * 印は SI 基本単位を示し，** は SI 組立単位で固有の名称と記号をもつものを示した．

（参考文献）

1）国際単位系（SI）－グローバル化社会の共通ルール－日本語版国際文書第 7 版，日本規格協会発行（1998）

単位と単位記号の表

量	単位の名称（SI 単位の定義）	単位記号
長　　さ	メートル（meter）*	m
	マイクロメートル（micro meter）	μm
	ナノメートル（nano meter）	nm
面　　積	平方メートル（square meter）	m^2
	アール（are）（土地面積に限定）	a
	ヘクタール（hectare）（土地面積に限定）	ha
体　　積	立方メートル（cubic meter）	m^3
	リットル（liter），（dm^3）	l, L
	キロリットル（kiloliter），（m^3）	kl, kL
	ミリリットル（milliliter），（cm^3）	ml, mL
	マイクロリットル（microliter），（mm^3）	μl, μL
平 面 角	ラジアン（radian）**	rad
	度（degree）	°
	分（minute）	′
	秒（second）	″
立 体 角	ステラジアン（steradian）**	sr
時　　間	秒（second）*	s
	分（minute），（60s）	min
	時（hour），（3600s）	h
	日（day），（86400s）	d
周 波 数	ヘルツ（hertz）**，（s^{-1}）	Hz
	メガヘルツ（megahertz）	MHz
回 転 数	回毎分（revolutions per minute）	rpm
重　　さ	キログラム（kilogram）*	kg
	グラム（gram）	g
	ミリグラム（milligram）	mg
	マイクログラム（microgram）	μg
	トン（ton），（Mg）	t
物 質 量	モル（mole）*	mol
	（g 分子，g 原子，g イオン，「当量」などの語は SI 単位では廃止された）	
濃　　度	・モル濃度（molar concentration または molarity……1 L の溶液の中に含まれる溶質のモル数） （規定濃度 N は用いない）	mol/1, mol/L
	・パーセント（percent）…（溶液中の 2 つの量の比）×100，を意味する．パーセントを使う時は，次のように，重量と重量の比か，容量と容量の比かを明確にして用いる．	%
	・重量パーセント	%（w/w）
	・容量パーセント	%（v/v）
	・（重量 / 容量）パーセント	%（w/v）
	・（容量 / 重量）パーセント	%（v/w）
	・溶液 100 g 当たりの溶質のミリグラム	mg/100 g
	・溶液 100 mL 当たりの溶質のミリグラム（mg% は用いない）	mg/100ml, mg/100mL
	・parts per million（何の比率か明示する）	ppm
	・parts per billion（何の比率か明示する）	ppb
	・parts per trillion（何の比率か明示する）	ppt

量	単位の名称（SI 単位の定義）	単位記号
力	ニュートン（newton）**，（kg・m・s^{-2}）	N
圧力・応力	パスカル（pascal）**，（N・m^{-2}）	Pa
粘度	パスカル秒	Pa・s
エネルギー・	ジュール（joule）**，（kg・m^{2}・s^{-2}）	J
熱量	カロリー（calorie），（4.184 J）　（栄養・代謝に限定）	cal
温度	ケルビン（Kelvin）*	K
	摂氏（Celsius），（0℃ = 273.15K）	℃
電流	アンペア（ampere）*	A
電荷・電気量	クーロン（coulomb），（s・A）**	C
電位差，電位，起電力	ボルト（volt），（J・A^{-1}・s^{-1}）**	V
静電容量	ファラド（farad），（A・s・V^{-1}）**	F
電気抵抗	オーム（ohm），（V・A^{-1}）**	Ω
工率，放射束	ワット（watt）**	W
インダクタンス	ヘンリー（henry），（V・A^{-1}・s）**	H
コンダクタンス	ジーメンス（siemens），（A・V^{-1}＝Ω^{-1}）**	S
光度	カンデラ（candela）*	cd
光束	ルーメン（lumen），（cd・sr）**	lm
照度	ルクス（lux），（m^{-2}・cd・sr）**	lx
光の波長	マイクロメートル（micrometer）	μm
	ナノメートル（nanometer）	nm
放射能，放射線	ベクレル（becquerel，放射性核種の放射能）**，（s^{-1}）	Bq
	グレイ（gray，吸収線量）**，（m^{2}・s^{-2}（＝J・kg^{-1}））	Gy
	カウント毎分（counts per minute）	cpm
	シーベルト（sievert；線量当量）**	Sv

〔付記 3〕　数と数式

3.1　小数点は 0.101 とし，.101 とはしない．

3.2　けた数の区切りは 5 530 000 とし，5,530,000 としない．

3.3　積は 101.325×10^{8} とし 101.325・10^{8} としない．

3.4　範囲を示す場合は（1.0～1.5）×10^{8} 又は（25±0.5）℃と書く．

3.5　数学的演算子（d，Δ など）および数学的定数（e，π，i など）は，ローマン体で印刷する．

3.6　商を表わす斜線（/）を用いるとき，混同を避けるためかっこを必要とする．

・$a+b/c+d$（$=a+bc^{-1}+d$ と混同する）とせずに（$a+b$）/（$c+d$）とする．

・$(a/b)/c$ は $a/b/c$ としてはならない．

3.7　二重の添字になる書き方はできる限り避ける．

〔付記 4〕　引用文献の記載法

4.1　著者名

和文著者名は，姓名共に書き，英文著者名は姓を先にし，ついで first および middle name のイニシャルを書く．著者が複数の場合は，各著者名の間に「,」を入れる．ただし，英文の場合，最後の名前の前は and のみを入れる．

4.2　論文題名

引用論文の題名を書く．

4.3　雑誌名

和文雑誌名は原則として略さない．欧文雑誌の略名は原則として最近の国際規格の ISO 4，およびそれに準拠して ISSN 国際センターが作成する目録マニュアル「ISSN Manual. Cataloguing Part」と略語表「List of Title Word Abbreviations」（http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php）に従う．略記形が不明の場合は，略記せずに完全誌名を記述する．

同じ雑誌が連続して引用される場合も "同上"，"ibid."は用いないで繰返して書く．

4.4　巻数，頁数，発行年

巻数はボールド体で書く．巻数を表記しない雑誌では，巻数の位置に発行年を西暦で書く．頁数は引用論文の最初と最後の頁数を－で結んで書き，次いで発行年を（　）で書く．

4.5　単行本の場合

著者名，章のタイトル，書名，版数，巻数，編集者名，出版社，発行地，頁数（最初と最後），発行年の順に書く．

4.6 特許の場合

特許権者または出願者名，題名，特許番号または公告番号，年月日の順に書く．

4.7 学会講演要旨集等の場合

学会要旨等は原則として引用しない．やむを得ず引用する場合は，講演者名，題名，学会大会資料名，頁数（複数頁の場合は最初と最後の頁数を－で結ぶ），開催地，開催年の順に書く．

4.8 文献記載例

1) 三ヶ日温子，薩摩橙大，温州みかんのカロチノイドに関する研究（第2報）近赤外線照射による温州ミカン果皮カロチノイドの変質，日本食品科学工学会誌，**48**，123-456（2001）．
2) Yoshida, K., Kirimura, O. and Danna, G., Change in the amount of SDS-insoluble membrane components by oxidants during breadmaking. *J. Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 99-999（2001）.
3) 佐藤昌康，味の知覚，「味覚の生理学」，第1版（朝倉書店，東京），pp. 1-22（1991）．
4) Mendel, D.S., Gene and chromosome. In "Introduction to quantitative genetics," 1st ed. (Ronald. Press. Co.), pp. 9-99（1999）.
5) 三井清司，色素分析一般，「植物色素-実験・研究への手引き」，第2版，林　孝三編，（養賢堂，東京），pp. 93-150（1988）．
6) Yokota, T., Brassinosteroids. In "Comprehensive natural products chemistry," Vol. 8, eds. Barton, D.H. R., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O. (Vol. ed., Mori, K.), Pergamon, pp. 99-107（1999）.
7) 藤山京司，早乙女成弘，上島輝光，小谷悠久，浸透圧の測定方法及び装置，特許第2802344号（2001.1.11）．
8) 深海潜太，食品花子，水産勝尾，畜産育雄，東京湾雑魚の魚種および異なる醤油麹が魚醤油の品質と成分に及ぼす影響，日本食品科学工学会第48回大会講演要旨集，p. 47，香川（2001）．

4.9 雑誌略名例

ボールド部分のみ残し，イタリックの部分は略す．単語の途中で略した場合はピリオドを打つ．

Agric*ultural and* **Biol***ogical* **Chem***istry*
Anal*ytical* **Biochem***istry*
Anal*ytical* **Chem***istry*
Appl*ied and* **Environ***mental* **Microbiol***ogy*
Arch*ives of* **Biochem***istry and* **Biophys***ics*
Bakers Digest
Biosci*ence,* **Biotechnol***ogy, and* **Biochem***istry*
Biochem*ical and* **Biophys***ical* **Res***earch* **Commun***ications*
The **Biochem***ical* **J***ournal*
Biochemistry
Biochim*ica et* **Biophys***ica* **Acta**
Biotechnol*ogy and* **Bioeng***ineering*
Carbohydr*ate* **Res***earch*
Cereal Chem*istry*
Eur*opean* **J***ournal of* **Biochem***istry*
FEBS Lett*ers*
Fed*eration* **Proc***eedings*
Food Sci*ence and* **Technol***ogy* **Int***ernational,* **Tokyo**
Food Sci*ence and* **Technol***ogy* **Res***earch*
Food Technol*ogy*
Food Technol*ogy in* **Aust***ralia*
HortScience
Int*ernational* **J***ournal of* **Food Sci***ence and* **Technol***ogy*
J*ournal of* **Agric***ultural and* **Food Chem***istry*
The **J***ournal of* **Appl***ied* **Bacteriol***ogy*
J*ournal of* **Bacteriol***ogy*
The **J***ournal of* **Biochem***istry*
The **J***ournal of* **Biol***ogical* **Chem***istry*
The **J***ournal of* **Cell Biol***ogy*
J*ournal of* **Chromatogr***aphic* **Sci***ence*
J*ournal of* **Chromatogr***aphy*
J*ournal of* **Dairy Sci***ence*
J*ournal of* **Ferment***ation and* **Bioeng***neering*
J*ournal of* **Food Sci***ence*
J*ournal of* **Food Technol***ogy*
J*ournal of* **Gen***eral* **Microbiol***ogy*
J*ournal of* **Lipid Res***earch*
J*ournal of* **Mol***ecular* **Biol***ogy*
J*ournal of* **Nutr***ition*
J*ournal of* **Stored Prod***ucts* **Res***earch*
J*ournal of* **Texture Stud***ies*
J*ournal of the* **Am***erican* **Chem***ical* **Soc***iety*
J*ournal of the* **Am***erican* **Oil Chem***ists* **Soc***iety*
J*ournal of the* **Am***erican* **Soc***iety for* **Hortic***ultural* **Sci***ence*
J*ournal of the* **Assoc***iation of* **Off***icial* **Anal***ytical* **Chem***ists*
J*ournal of the* **Sci***ence of* **Food** *and* **Agric***ulture*
Lipids
Nature
Phytochemistry
Plant *and* **Cell Physiol***ogy*
Plant Physiol*ogy*
The **Rice J***ournal*
Science
Z*eitschrift für* **Lebensm***ittel*-**Unters***uchung und* **Forsch***ung*

4.10 引用URL

データベースやホームページなどは更新・削除され，参照できなくなる恐れがあるので，引用はできるだけ避ける．

引用する際には，引用 URL 番号は引用順に通し番号とし，本文中の該当箇所に，「[i)ii)]」，「[i)~iii)]」，「[i)ii)~iv)vi)]」のように上付きで指示する．「文献」の次に「引用 URL」と書き，URL をまとめて書く．なお，該当する情報を入手した年月日を括弧内に記入する．

記載例

引用 URL

i） http://www.jsfst.or.jp/journal/index.html (2008. 9. 3)

〔付記 5〕　**印刷上の活字の指示**

特別な理由のない限り，立体のギリシャ文字は次のものに限る．

Γ，Δ，α，β，γ，δ，μ，Π，π，Σ，Ω

上付き又は下付き記号としては，原則として次のものを用いることができる．

・(マル)，′，″，∞，*，

+，−，†(ダガー)，‡(ダブルダガー)，Φ(プリムソル)

付　　表

付表1　カラー（原色版）印刷料金（円）

カラー印刷 1頁60000円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合，追加1頁当たり30000円 ・表裏印刷となる場合は，1枚2頁で2×60000円
2色カラー印刷 1頁40000円	・2頁以上で表裏印刷とならない場合，追加1頁当たり20000円 ・表裏印刷となる場合は，1枚×2頁で2×40000円

付表2　掲　載　料　（円）

頁　数	報文，技術論文	研究ノート，速報
2以下	5000	5000
3	5000	17000
4	5000	29000
5	5000	41000
6	17000	*
7	29000	
	*	

*以後1頁加えるごとに12000円を加算する

付表3　別刷価格表（抜粋）　（円）

	50部（表紙なし）	100部（〃）	150部（〃）	200部（〃）
2頁	2800	3800	5300	6800
4頁	3800	5300	7300	8800
6頁	4800	6800	9300	10800
8頁	5800	8300	11300	12800
表紙付き加算	3000	3800	4700	5600

（注）一件につき手数料800円含む
フルカラー頁を含む別刷りの場合は，1部につき40円を加算する
2色カラー頁を含む別刷りの場合は，1部につき30円を加算する

付表4　英文校閲料（円）

1編	2650

食品総合研究所研究報告

第77号

平成25年３月　印刷　平成25年３月　発行
（非売品）

編集者　独立行政法人 農業･食品産業技術総合研究機構
発行者　食 品 総 合 研 究 所
所　長　　林　　　清
（〒305-8642　茨城県つくば市観音台2-1-12）
印刷所　茨城県土浦市大畑565-2
筑波印刷情報サービスセンター協同組合